Sekundäre Synapsenbildung durch Implantation freier, autologer Nervenimplantate in denervierte Muskulatur

Histologische und elektrophysiologische Untersuchungen am M. gastrocnemius des Meerschweinchens

von
CLAUS NAUMANN

1970

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-
und Ohrenkranke Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Horst L. Wullstein

SEKUNDÄRE SYNAPSENBILDUNG DURCH IMPLANTATION FREIER, AUTOLOGER NERVENIMPLANTATE IN DENERVIERTE MUSKULATUR

Histologische und elektrophysiologische Untersuchungen am M. gastrocnemius des Meerschweinchens

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Claus Naumann aus Halle/Saale

Würzburg 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Priv. Doz. Dr.med. Malte Erik Wigand
Korreferent: Professor Dr.med. Hans Georg Mertens

Tag der Promotion:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0076

MEINEN ELTERN

I. EINLEITUNG 1

1. Nervenverletzungen - Wiederherstellung
2. Nervenimplantation

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN 2

1. Zusammenhang Nervenzelle - Neurit - Synapse - Muskelfaser (Funktionseinheit)
2. Nervendegeneration
3. Nervenregeneration
4. Ausbildung neuer motorischer Endplatten

III. METHODIK 11

1. Operationsmethoden
2. Nachbehandlung der Tiere
3. Auswertung

IV. ERGEBNISSE 15

1. Äußere Merkmale
2. Histologische Ergebnisse
3. Elektrophysiologische Auswertung
4. Zustand nach Denervierung

V. DISKUSSION 24

1. Fragen der Implantationstechnik
2. Äußerlich sichtbare Veränderungen
3. Voraussetzungen der sekundären Synapsenbildung
4. Elektrophysiologische Untersuchungen
5. Bewegungskoordination

VI. ZUSAMMENFASSUNG 33

VII. LITERATUR 34

I. EINLEITUNG

Periphere Nervenläsionen durch stumpfe oder scharfe Traumen, durch Druck benachbarter Organe oder Tumoren führen meistens zu einem Ausfall afferenter und efferenter Muskelinnervation. Diese Arbeit konzentriert sich darauf, die Wiederherstellung der efferenten Erregungsleitung nach Durchschneidung der Motoneurone durch künstliche Verbindung des proximalen Nervenstumpfs mit dem denervierten Endorgan Muskel zu studieren.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht der histochemische Nachweis neuer motorischer Endorgane als ein Zeichen für die wiedergewonnene Funktion von Nerv und Muskel. Besonderer Wert wurde auf die Verwendung von Nerventransplantaten gelegt, die der Überbrückung von Nervendefekten dienten.

Zur Beurteilung der Resultate schien es notwendig, ausführlich auf die theoretischen Grundlagen von Nervendegenerations- und Regenerationsprozessen einzugehen und die Voraussetzungen zum Entstehen neuer motorischer Endplatten zu erörtern.

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.) Bei der Untersuchung von Vorgängen im Skelettmuskel, die ihren Ursprung in einer Veränderung der motorischen Innervation haben, läßt sich nicht die Muskelfaser oder die Endplatte isoliert betrachten, sondern sie bilden mit dem zuführenden Nerven und der motorischen Vorderhornzelle eine Motorische Einheit. Diese überschreitet die anatomischen Systemgrenzen, wie es sich am besten an der Synapse zeigt, deren präsynaptische Membran ein Teil des Nerven, deren postsynaptische Membran eine Struktur des Muskels ist. Somit ist es notwendig, vor der Reinnervation des Muskels von der Regeneration des Nerven und der Ausbildung neuer motorischer Endplatten zu sprechen. Alle drei Prozesse müssen nacheinander ablaufen, um eine normale Erregungsleitung und -übertragung vorher denervierter Skelettmuskulatur zu ermöglichen. Die Synapse steht als Relais im Mittelpunkt des Systems; ihrer Wiederherstellung kommt deshalb bei der Reinnervation besondere Bedeutung zu.

2.) Wenn man von der Verletzung des peripheren Neurons ausgeht und sich dabei auf die Betrachtung der motorischen Nervenbahnen beschränkt, so interessieren in diesem Zusammenhang alle Veränderungen, die eine solche Verletzung nach sich zieht. Seit SEDDON unterscheidet man drei Formen von Nervenlähmung:

Die Neurapraxie, wenn es sich nur um einen funktionellen Block infolge Myelinentmischung handelt.
Die Axonotmesis, wenn nur der Axenzylinder durch absteigende Wallersche Degeneration zugrunde geht.
Die Neurotmesis, wenn eine durchgehende Kontinuitätstrennung des Nerven eingetreten ist, z. B. durch Schnitt.

In der Praxis ist eine schnelle Unterscheidung von 1 und 2 erwünscht, da die Prognose der Neurapraxie günstig, diejenige der Axonotmesis zweifelhaft ist. Zu einer Degeneration von Nervenfasern führen nur die Axonotmesis und die Neurotmesis. Sie ziehen dieselben morphologischen Folgen in Nervenfaser und Muskel nach sich.

Nach v. MURALT lassen sich peripher von der Verletzung drei Stadien der Wallerschen Degeneration unterscheiden, bei denen folgende Veränderungen an den Schwannschen Scheiden auftreten können:

1. Es kommt zu einer Retraktion der Nervenscheiden, was zum Freiliegen nackter Axonstücke an den Ranvierschen Knoten führt.
2. Das Myelin zerfällt zu Schollen, und die Schwannschen Zellen zeigen eine starke Proliferation mit Phagocytose der Axontrümmer.

3. Nach etwa 300 Stunden schrumpfen die Schwannschen Scheiden und bilden die sogenannten Büngenerschen Bänder.

Hieraus wird deutlich, daß die Schwannsche Zelle von der Degeneration mitbetroffen wird und eine isolierte Betrachtung des Achsenzylinders nicht zweckmäßig ist.

Als äußeres Zeichen der Nervendegeneration findet man zunächst eine Abnahme des Faserdurchmessers. Der dauernde periphere Strom von Lipoproteiden, Aneurin und Enzymen aus der Nervenzelle (v. MURALT) versiegt. Dementsprechend nimmt der Gehalt an Acetylcholin (ACh) und Aneurin im peripheren Neuron beträchtlich ab. Das Aneurin geht wahrscheinlich in die Schwannsche Zelle über. Eine Folge davon ist eine verminderte Erregbarkeit, die sich in einer geringeren Leitungsgeschwindigkeit bis hin zu völligem Leitungsverlust ausdrückt. Nach den Untersuchungen von KIRALY und KRNJEVIC zeigte sich besonders ein Abfall bei der Leitung von Impulsen hoher Frequenz, und die Empfindlichkeit gegen Kälte nahm zu. Die afferenten Fasern waren außerdem stärker betroffen als die efferenten. Der entscheidende Faktor scheint dabei die größere Nähe der afferenten Ganglienzellen zum Sitz der Verletzung zu sein.

CAUSEY und STRATMANN stellten drei Alternativen auf, wie der Leitungsverlust auftreten kann:

1. Es ist möglich, daß nach Denervierung die Degeneration einheitlich distal von der Schnittstelle auftritt und daß zu einem bestimmten Zeitpunkt die Leitung auf der ganzen Strecke der Faser fehlt, oder daß
2. der Verlauf der Degeneration von der Schnittstelle zentrifugal fortschreitet, oder daß
3. die Degeneration in der Peripherie beginnt und in zentraler Richtung fortschreitet.

SALAFSKY und JASINSKI fanden, daß zwar ein Unterschied in der Dauer bis zum Leitungsabfall bestand, je nachdem in welcher Höhe am Bein, d. h. in welchem Abstand von der Nervenzelle, der Nerv durchtrennt wurde, daß jedoch nach verschiedenen zeitlichen Intervallen die Funktion auf der ganzen Länge des Nerven ausfiel. Das würde also der ersten Möglichkeit von CAUSEY und STRATMANN entsprechen.

Aber nicht der degenerierende Nerv bildet das erste Hindernis beim Funktionsausfall im gesamten System, sondern schon vorher fällt die neuromuskuläre Übertragung aus. Dabei besteht eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Länge des peripheren Stumpfs und dem zeitlichen Ausfall der Endplatten. Der Nerv scheint einem auslaufenden Schlauch gleich zu sein, der noch für eine bestimmte Dauer

Vorrat enthält. Bei Albinoratten bewirkte jeder Zentimeter extramuskulären Nervs eine Verlängerung der Funktion um etwa 40 Minuten (SLATER). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten starke Veränderungen an der Endplatte. Die hervorstechendsten Merkmale sind Schwellung und Zerfall der Mitochondrien und Bildung sogenannter Honigwabenstrukturen durch Zusammenballung benachbarter Vesikel (BIRKS, KATZ und MILEDI) sowie eine charakteristische Granulation am postsynaptischen Sarkoplasma (CSILIK und SAVAY). Die Bläschen scheinen freigesetztes Calcium zu enthalten und für die Ausbildung einer ACh-sensiblen Zone verantwortlich zu sein, von der unten noch zu sprechen ist.

Als Gradmesser der ungestörten Funktion einer Endplatte gilt ihre lokale, spontane, unterschwellige Aktivität. Dabei werden Miniaturendplattenpotentiale (MEPPs) in charakteristischer Frequenz und Amplitudenverteilung freigesetzt. Bei Ratten treten diese MEPPs mit einer Amplitude von 0,5 - 1 mV und einer Frequenz von 1 - 2/sec auf. Es besteht eine Abhängigkeit von Temperatur, osmotischem Druck und bestimmten Pharmaka, wie etwa Prostigmin (LILEY). Diese spontane Entladung fällt etwa fünf Tage nach beginnender Nervendegeneration aus, bildet sich aber innerhalb einer Woche wieder in gewissem Umfang zurück und hält dann noch über mehrere Wochen an (BIRKS, KATZ und MILEDI). Vermutlich übernimmt die Schwannsche Zelle nach dem Verschwinden der Axonenden den Kontakt mit der Muskelzelle und ist damit verantwortlich für die erneute Freisetzung geringer ACh-Stöße. SLATER fand in einigen Fällen MEPPs ohne Überleitung, in keinem Fall jedoch eine Überleitung ohne MEPPs, was ja auch der Vorstellung von der humoralen Erregungsübertragung widersprechen würde.

3.) Neben dieser Degeneration von Nerv und Synapse zeigen sich aber schon früh regenerative Vorgänge. In jedem Fall ist der zentrale Stumpf bemüht, ausgehend von der Nervenzelle seine Fasern wieder in die Peripherie zu schicken. Dieses Bestreben ist dem embryonalen Wachstum sehr ähnlich, nur daß hier der degenerierte periphere Nervenstumpf als Leitstruktur dienen kann, während in der embryonalen Phase die Stränge frei auswachsen müssen.

Es erhebt sich nun die Frage nach den Ursachen, die für die Regeneration verantwortlich sind, insbesondere aber danach, welche Rolle dem peripheren Nervenstumpf dabei zukommt. Die Vorgänge, die nach Axonotmesis und Neurotmesis ein beschleunigtes Auswachsen der proximalen Faserenden bewirken können, sind nach WEISS folgende:

1. Die Synthese des Neuroplasmas in der Nervenzelle und daraus folgend ein peripher gerichteter Nachschub (vis a tergo).
2. Das Ausmaß des Abstroms in die Peripherie ist abhängig von der Synthese und dem peripheren Widerstand.
3. Die Geschwindigkeit der Neuroplasmasynthese, die retrograden Wirkungen aus dem Innervationsgebiet unterliegt. So findet sich direkt nach der Durchschneidung eine minimale Synthese.
4. Der Konvektionsstrom führt zum Druck auf die Wandung des Neuralrohrs. Er ist abhängig vom Kaliber der Nervenfaser und der Dehnungsfähigkeit der Nervenscheiden.
5. Der Zustand der Schnittstelle. Narben führen zur Erhöhung des peripheren Widerstandes.

Zunächst können wir also einen dauernden peripher gerichteten Strom von der Nervenzelle ausgehend annehmen, der normalerweise die Ernährung und Funktion sicherstellt und bei der Verletzung gewissermaßen als vis a tergo den Achsenzylinder aktiv vorantreibt. Daß diese Vorstellung von einem einfachen distal gerichteten Strom nicht alle Phänomene an der Schnittstelle erklärt, veranlaßte LUBINSKA dazu, neben dieser proximo-distalen Bewegungsrichtung einen rückläufig zum Perikaryon führenden Axoplasmastrom zu fordern. In jedem Fall erhält das Axon von zentral Impulse, die es befähigen, die Schnittstelle zu überwinden.

Nun ist es aber keineswegs so, daß alle Fasern bemüht sind, die entstandene Lücke auf dem schnellsten Wege zu schließen und direkt in den peripheren Stumpf einzuwachsen. Das könnte bedeuten, daß eine Chemotaxis das Regenerat anlockt. Diese Ansicht haben WEISS und TAYLOR mit ihren Untersuchungen widerlegt, indem sie bei der Ratte Nerven in gegabelten Arterien regenerieren ließen. Die einzelnen Äste führten dabei entweder in Blindsäcke oder in Kanäle, die degenerierende Nerven, Sehnen oder Fettgewebe enthielten. Die Nervenfasern zeigten jedoch weder die Tendenz in bestimmte Kanäle einzuwachsen, noch beim Erreichen der Nervenstücke diesen entgegenzustreben.

Will man einen durchtrennten Nerven wieder vereinigen, so kommt es nur darauf an, die entstandene Lücke entsprechend klein zu machen, um das Einsprossen von Fibroblasten zu verhindern und die physiologische Ligatur, wie v. MURALT sie nennt, die aus der Proliferation der Schwannschen Zellen entsteht, möglichst nicht zu komprimieren.

Über die Anzahl der Fasern, die nach Überwindung dieses Hindernisses im peripheren Stumpf abwärts ziehen, gehen die Ansichten der einzelnen Untersucher auseinander. Doch scheint es zunächst einmal im proximalen Stumpf zum Aussprossen und damit zur Vermehrung der Faseranzahl zu kommen. Nach SHAWE besteht hierbei noch ein Unterschied je nach Art der Verletzung. So fand er nach Quetschung drei Sprosse und nach Schnitt fünf Sprosse pro zentraler Faser. Es scheint, als könne damit schon der unvermeidliche Verlust durch aberrierende Fasern kompensiert werden. GUTMANN und SANDERS zählten nach Quetschung des N.peroneus peripher etwa die gleiche Anzahl wie proximal (6000 - 9000). Durchschneidung führt in jedem Fall zu einer weniger vollständigen Wiederherstellung der Faseranzahl, wie auch die Arbeiten von SANDERS und YOUNG bestätigen.

Wie im normalen Nerven hängt auch nach Regeneration die Leitungsgeschwindigkeit von der Internodienlänge und der Faserstärke ab. Was entscheidet aber darüber, ob eine auswachsende Faser dick oder dünn wird, was bestimmt ihre Leitungsqualität? KRÜCKE konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen die Beziehung zwischen Achsenzylinder und Schwannscher Zelle eindeutig klären. Die Einbettung der Axone in das Plasma der Schwannschen Zelle, die durch spiralige Aufrollung des Mesaxons die neue Markscheide bildet, erinnert an die Vorgänge bei der Nervenentwicklung. Auch TERRY und HARKINS fanden in regenerierenden Nervenscheiden eine Feinstruktur, die der im embryonalen Nerven sehr nahekam. Nur bleiben in den Zellen die Abbauprodukte alter Fasern noch lange erhalten und veranschaulichen deutlich das Nebeneinander von De- und Regenerationsprozessen. Die Hypothese, daß die Schwannschen Scheiden die Axone wie in Röhren leiten, ist wohl nur bedingt richtig, denn diese wachsen nach KRÜCKE zunächst an den Oberflächen der Schwannschen Zellen und sogar frei im Interstitium, bis sie von dem Mesaxon spiralig eingescheidet werden. Dabei kontrolliert die Schwannsche Zelle das Kaliber der neuen Fasern. Sehr naheliegend, aber nicht bewiesen ist auch die Vorstellung, daß der Faserdurchmesser vom Kaliber der Ursprungsfaser abhänge.

Zur Beurteilung der vollendeten Regeneration von zuvor degenerierten Nervenabschnitten kann die statistische Verteilung (Histogramm) der Faserquerschnitte herangezogen werden. Das Histogramm eines normalen peripheren Nerven wie des N.peroneus beim kleinen Nager enthält Querschnitte von 1 - 20 µ mit einer deutlichen zweigipfligen Verteilung. Dabei liegen die Maxima etwa bei 2 µ und 13 µ (GUTMANN und SANDERS). Das entspricht den Qualitäten der schnellen motorischen und der sensiblen Fasern. Nach Regeneration fanden alle Untersucher, daß Quetschung zwar die Werte insgesamt senkt, aber die typische

Querschnittsverteilung erhalten bleibt, während sie nach Durchschneidung und End-zu-End-Naht einem eingipfligen Histogramm weichen muß (EVANS und MURRAY, SANDERS und YOUNG, GUTMANN und SANDERS, ZELENA und HNIK). Es entstehen Unterschiede zur früheren physiologischen Funktion des Nerven, und eine Folge davon ist die Änderung der gewohnten Reflexkoordination. Die Leitungsgeschwindigkeit nimmt allgemein ab und kann nach CRAGG und THOMAS bestenfalls eine Höhe von 75 % des Ausgangswertes erreichen.

Ein ganz entscheidender Einfluß auf die Reifung des regenerierenden Nerven, die man als zweites Stadium nach dem Prozeß des Aussprossens bezeichnen kann, kommt der Verbindung mit der Muskelfaser zu. WEISS und TAYLOR beobachteten, daß nach funktionellem Kontakt in der Peripherie die Fasern peripherer Nerven einen größeren Durchmesser annehmen. SANDERS und YOUNG beschrieben eine selektive Hypertrophie. In ihren Versuchen wuchsen mehrere Fasern zunächst in den einzelnen Scheiden abwärts - nach heutiger Vorstellung wohl an den Scheiden entlang -, so daß sich das Bild eines marklosen Nerven ergab. Wenn ein Achsenzylinder dann Verbindung zur Endplatte aufgenommen hatte, hypertrophierte er auf Kosten der anderen. Kam kein Kontakt zustande, begannen viele Fasern mit der Markbildung, aber keine wurde stärker. Sicherlich kommt es dabei nicht so sehr auf das Erreichen der Endplatte oder die Ausbildung einer neuen an, als vielmehr auf die damit verbundene Funktionsrückkehr im gesamten System. Denn nach den Untersuchungen von EVANS und MURRAY am Kehlkopfast des N.recurrens reifen Nervenfasern ohne peripheren Kontakt weniger schnell als solche, die Endplatten ausgebildet haben. Diese Beschleunigung des zweiten Stadiums der Regeneration gehört zu den retrograden Wirkungen der Endorgane, von denen einleitend schon die Rede war.

4.) Das entscheidende Ereignis der gesamten Regenerationsvorgänge ist also die Ausbildung eines neuen Nerv-Muskel-Kontakts. Die motorischen Endplatten, die mit ihren präsynaptischen Membranen Produkte des Nerven, mit den postsynaptischen Membranen Bildungen der Muskelfasern sind, liefern die Voraussetzungen zur Übertragung der Reizpotentiale und damit zur Funktion des Muskels.

Zunächst sei ein historischer Rückblick gestattet: GAD erwähnt motorische Endplatten schon 1882 und bezeichnet sie als einen "Apparat sui generis mit eigenem, besonders lebhaften Stoffwechsel". Er schließt dies aus der Tatsache, daß die neuromuskulären Nervenendigungen den übrigen Teilen des Nerv-Muskel-Apparats an Erschöpfung voraneilen. KÜHNE schrieb 1887 eine lange Abhandlung, in der er auf die Formen der einzelnen Endplatten oder Geweihe, wie er sie nennt, in der aufsteigenden Tierreihe eingeht. Er stellt auch schon die typische Lokalisation in der Fasermitte bei bestimmten Muskeln fest.

Wie bei Nervenfasern sind Regenerationsvorgänge an der motorischen Endplatte der embryonalen Entwicklung durchaus vergleichbar. DRACHMANN konnte bei Hühnerembryos zwischen dem 10. und 13. Bruttag cholinesterasehaltige Endplatten nachweisen und diese mit Curare, Succinylcholinchlorid und Dekamethoniumbromid ausschalten. Während der weiteren Entwicklung fand er eine konstante Empfindlichkeit für diese Mittel, während tiefgreifende morphologische Veränderungen an den Endorganen vor sich gingen. ÄNGGARD und OTTOSON untersuchten die pränatale Entwicklung der Muskelaktivität beim Schaf und konnten an Hand der abfallenden Latenzzeiten die fortschreitende Ausbildung der neuromuskulären Verbindung verfolgen.

Normalerweise sind Skelettmuskeln refraktär gegen jegliche Hyperneurotisation, d. h. Annahme eines weiteren Nerven zusätzlich zur bestehenden eigenen Versorgung. HARRISON wies 1910 auf die Analogie zwischen Muskelfaser und einmal befruchteter Eizelle hin, die dann keine Spermatozoen mehr aufnimmt. Selbst ein Überangebot an Nervenfasern führt nicht zur Mehrfachinnervation der einzelnen Muskelfasern. Daraus schließt FORT, daß die Muskelzelle einen empfänglichen und einen unempfänglichen Zustand hat und daß sie eine Kontrolle ausbildet über die Anzahl der Nervenfasern, die mit ihr Verbindung aufnehmen können. Er ließ die Frage offen, welche Vorgänge diesen Zustand beeinflussen können und wie sich die Muskelfaser dann zum neuen Nerven verhält.

MILEDI nahm an, daß die lokale Verletzung von Muskelfasern, zu der es bei der Implantation der Nerven kam, experimentell die Barriere überwinden kann, die eine zusätzliche Innervation von Muskeln verhindert. Den Gegenbeweis konnten GWYN und AITKEN führen, indem sie bei der Implantation nur die Muskelfaszie schlitzten und den Nervenstumpf mit Fibrin fixierten. Demnach ist die mechanische Verletzung sicherlich keine notwendige Voraussetzung für die Entstehung neuer motorischer Endplatten. Der Hauptfaktor scheint ihnen die Verfügbarkeit denervierter Muskelfasern und nicht die Verletzung zu sein. Trotzdem läßt sich dieses Argument nicht von der Hand weisen, denn Nerven, die in einen normal innervierten Muskel einwachsen, bilden nach AITKEN in geringem Umfang doch neue Endplatten, und zwar wahrscheinlich in Muskelfasern, die durch die Operation verletzt sind.

FRANCK und ERICKSON konnten an Froschmuskeln zeigen, daß eine gesteigerte Empfindlichkeit der normal innervierten Endplatte gegenüber ACh eintritt, sobald die anderen Endplatten derselben Muskelzelle denerviert sind. Somit bleiben Denervierungsfolgen nicht auf eine Endplattenzone beschränkt, sondern betreffen die ganze Muskelfaser. HOFFMANN hält dafür einen humoralen Mechanismus für verantwortlich. In seinen Untersuchungen fand er ein ähnliches Maß

an Aktivität bei Nervenfasern, die in einen denervierten Muskel einwachsen, wie bei solchen, die einen normalen, aber neben denervierten Fasern gelegenen Muskel versorgen. Demnach kann die Denervierung selbst noch nicht der wesentliche Vorgang sein, der eine Muskelfaser "empfänglich" macht, obwohl sie in jedem Fall diesen Zustand zur Folge hat.

Wie wir oben sahen, führt die Denervierung zur mangelnden Transmitterfreisetzung an den Endplatten. Dieser Effekt läßt sich auch pharmakologisch erreichen, und so fand THESLEFF an anatomisch intakten, aber mit Toxin von Chlostridium botulinum behandelten Endplatten, daß primär die Abnahme der ACh-Freisetzung und nicht die Nervendegeneration verantwortlich für die Zustandsänderung der Muskelfaser ist. Entscheidend ist dabei die sukzessive Ausbreitung der ACh-sensiblen Zone, die normalerweise auf die Gegend der Endplatte beschränkt ist, über die gesamte Oberfläche der Muskelfaser. MILEDI bestimmte die sensitive Länge einer Faser mit 1,1 mm bei einem Ausmaß der Nervenendzone von 50 - 500 µ. Auch er fand die charakteristische Ausdehnung dieser sensitiven Zone nach Denervierung schließlich über die gesamte Faseroberfläche.

Darüber hinaus haben Untersuchungen der ACh-Empfindlichkeit an fetalen und neugeborenen Ratten von THESLEFF gezeigt, daß die Muskelfaser vor einer funktionell intakten Innervation schon in ihrer ganzen Länge empfindlich gegen bestimmte Stoffe ist. Diese Ergebnisse ließen ihn vermuten, daß der Skelettmuskel im frühen embryonalen Stadium der Innervation und in gleicher Weise nach Denervierung auf seiner Oberfläche einheitlich empfindlich gegen ACh ist. Nachdem dann ein funktioneller Kontakt zwischen Nerv und Muskel zustande gekommen ist, schrumpft die chemisch empfindliche Zone von beiden Faserenden her auf die Endplatte zusammen. Eine echte Überempfindlichkeit der Rezeptoren auf ACh konnte er nicht feststellen; eine solche ist zur Erklärung des neuen Nerv-Muskel-Kontakts auch nicht mehr nötig.

Mit der Ausdehnung der ACh-sensiblen Zone über die gesamte Muskelfaser ist also die wesentliche Voraussetzung dafür geschaffen, daß eine Innervierung entstehen kann. In welcher Weise die Nervenfasern darauf reagieren und ob eine Bevorzugung bestimmter Nerven besteht, wurde in mehreren Arbeiten untersucht. ELSBERG war der Ansicht, daß unter gleichen Bedingungen immer der eigene Nerv die Verbindung zum Muskel wiederherstellen und damit einem fremden Implantat zuvorkommen wird. FENG, WU und YANG gingen sogar noch weiter und behaupteten, fremde Fasern könnten keine richtigen neuromuskulären Verbindungen herstellen. Nach Durchtrennung und Wiedervereinigung der zusätzlich um 45 ^{o} gegeneinander gedrehten Nervenstümpfe blieb die Reinnervation ausgesprochen selektiv. Bei getrennter Reizung bestimmter Fasergruppen reagierten

die Tiere mit reiner Kontraktion des ehemals zugehörigen Muskels, obwohl bei der Überkreuzung auch ein Faseraustausch stattgefunden haben mußte.

Andere Untersucher lehnen eine Selektivität bei der Reinnervation entschieden ab. WEISS und HOAG setzten bei ihren Versuchen an Ratten den N.tibialis und den N.peroneus in Konkurrenz zur Reinnervierung der plantaren Extensorengruppe (Gastrocnemius, Soleus, Plantaris). Dazu dienten ihnen die zusammenlaufenden Äste einer Arteriengabel. Nach vollständiger Regeneration zeigte sich, daß Fasern beider Nervenäste die Muskeln gleichmäßig innerviert hatten und der eigenen Versorgung kein Vorzug vor fremden Fasern zukam.

Auch ist es schwer vorstellbar, daß die Schwannschen Zellen die Fasern wieder zu ihren alten Endplatten im Muskel leiten. Wie wir sahen, bilden sie keine festen Bahnen, von denen die Nerven nicht abschweifen können. Vielmehr dienen sie bei der Anlagerung der Axone lediglich als Leitstruktur zum Muskel hin. So steigt denn auch bei der Reinnervation die Zahl der doppelt innervierten Muskelfasern. Nach BERNSTEIN und GUTH nahm ihre Zahl von normalerweise 5 - 10 % auf 15 - 20 % zu. GUTH und ZALEWSKY zählten in ihrer Arbeit 38 % doppelt innervierter Fasern mit einem durchschnittlichen Abstand von 2 mm zwischen den einzelnen Synapsen. Diese Hyperneurotisation kann als Überschneidung der Einflußbereiche zweier Nervenfasern betrachtet werden. Bei getrennter Reizung der Ursprungsfasern spricht jeweils die gleiche Muskelfaser an, und bei gemeinsamer Reizung findet sich keine Summation der Muskelkraft. Damit tritt uns deutlich die fehlende Selektivität vor Augen, die der Auswahl des Implantats keine Schwierigkeiten entgegensetzt, aber dafür die Wiederherstellung einer koordinierten Willkürmotorik erschwert, wenn nicht gar unmöglich macht.

Zum Schluß wäre noch zu klären, ob denn wirklich der implantierte Nerv für ein Wiederentstehen des Nerv-Muskel-Kontakts verantwortlich ist. Dazu durchtrennten GUTH, ZALEWSKY und BROWN ein sieben Wochen altes Nervenimplantat und fanden, daß nach einer weiteren Woche die Bereitstellung der Endplatten-ACh-Esterase als ein Maß für die intakte Funktion der Endplatte um 50 % gegenüber der Kontrollgruppe abgesunken war.

Demnach sind die Ausdehnung der ACh-sensiblen Zone über die gesamte Muskelfaser sowie das Einwachsen des Nerven und die daraus resultierende ACh-Freisetzung die notwendigen Voraussetzungen für das Entstehen neuer motorischer Endplatten.

III. METHODIK

1.) Nach Basisnarkose mit 0,3 ml 25 %igem Urethan/100 g Körpergewicht i. p. und Lokalanästhesie der Kniekehle mit Novocain wurden unter zusätzlicher Gabe von Äther 47 Meerschweinchen in Asepsis operiert. Die Tiere hatten ein Gewicht von 250 - 600 g.

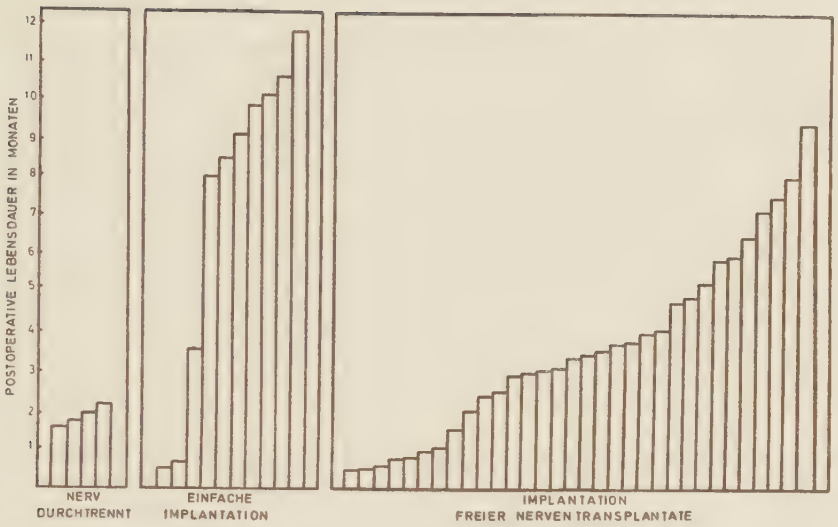
Drei Operationstypen wurden angewandt:

Typ I: Einfache Implantation (10 Tiere)
Nach einem Hautschnitt über der Kniekehle wurde die Aufzweigung des N.ischiadicus in den N.tibialis, den N.peroneus und den N.cutaneus surae freigelegt (Abb. 2). Über den N.tibialis wurde der M.gastrocnemius indirekt mit elektrischen Rechteckimpulsen von 1 - 20 V und Impulsfolgefrequenzen zwischen 1 und 100 Hz gereizt. Als Impulsgeber diente ein Disa-Reizeinschub aus dem Disa-Dreikanal-Elektromyographen, der von einer Tektronix-Impulsgenerator-Einheit gesteuert wurde. Die synchronisierten Summenaktionspotentiale wurden mit dem Oscilloskop (Tektronix 455) kontrolliert und fotographisch sowie auf Magnetband gespeichert.

Der N.peroneus des rechten Beins wurde soweit wie möglich distal durchtrennt und etwa 1 cm nach proximal freipräpariert. Der N.tibialis wurde am Eintritt in den M.gastrocnemius durchtrennt und reseziert, der N.peroneus in einem Schlitz des Muskels durch atraumatische Naht der Muskelfasern fixiert. Der N.cutaneus surae wurde reseziert.

Typ II: Implantation von freien Nerventransplantaten (33 Tiere)
Nach Hautschnitt, Darstellung der Kniekehle und Reizung wie oben wurde der rechte N.tibialis am Eintritt in den M.gastrocnemius durchtrennt und reseziert. Vom N.peroneus wurde ein etwa 1 - 2 cm langes Stück reseziert und mit atraumatischer Seidennaht an den proximalen Tibialisstumpf angenäht (Abb. 3). Das distale Ende des Peroneustransplantats wurde wie bei Typ I in einen Schlitz des M.gastrocnemius gesteckt und durch atraumatische Naht der Muskelfasern fixiert (Abb. 4 u. 5).

Typ III: Nervendurchtrennung (4 Tiere)
Nach Hautschnitt und Darstellung der Kniekehle wurden die Nn.tibialis, peroneus und cutaneus surae des rechten Beins an der Aufzweigung des N.ischiadicus durchtrennt und je 5 mm reseziert. Die Wunden wurden in allen Fällen mit Seide atraumatisch vernäht.



(Abb. 1: Operationstypen und postoperative Lebenszeiten)

2.) Nach einfacher Implantation lebten die Tiere zwischen 14 Tagen und 12 Monaten, nach Implantation freier Nerventransplantate zwischen 14 Tagen und 9 1/2 Monaten. Die Tiere des dritten Operationstyps lebten zwischen 6 und 10 Wochen.

Jeweils vier Wochen nach der Operation wurde bei einem Teil der Tiere (24 Stück) der N.ischiadicus am Oberschenkel der operierten Seite zur Kontraktion des M.gastrocnemius perkutan elektrisch gereizt. Mit einer Hautelektrode wurden je nach Reizschwelle Stromstöße von 4 - 15 V und 4 msec Dauer mit einer Frequenz von 1/sec 3 min lang gegeben. Diese Elektrisierbehandlung im Abstand von zwei Tagen dauerte zwischen 2 und 5 Monaten an.

Der Rest der Meerschweinchen (23 Stück) verbrachte die Zeit bis zur Auswertung ohne jede weitere Behandlung im Stall.

3.) Zur Auswertung wurden die Tiere in gleicher Weise wie oben narkotisiert und nach Inspektion des Unterschenkels und der Füße der größte Umfang der Waden auf beiden Seiten gemessen. Danach wurde die Operationsstelle eröffnet und die Kniekehle freigelegt (Abb. 6). Es zeigten sich in den meisten Fällen Verwachsungen in der Umgebung des Nervenimplantats und eine spindelförmige Auftreibung der Nervennaht. Indirekte Reizung über das Implantat und direkte Reizung der Muskeloberfläche ergaben in allen Fällen Kontraktionen des M. gastrocnemius. Die Muskelaktionspotentiale wurden mit einer bipolaren Makroelektrode abgeleitet und über einen Oszillographen dargestellt.

Anschließend wurde der M. gastrocnemius vollständig herauspräpariert und die Tiere durch weitere Gabe von Äther getötet. Um Kontrakturen zu verhindern, wurden die Muskeln auf Korkbrettchen aufgespannt und unter mit physiologischer NaCl-Lösung getränkten Läppchen gegen Austrocknen für eine Stunde auf Eis gelegt. Danach wurden sie mit CO_2 -Schnee eingefroren und langsam wieder bis auf -12 ^{o}C erwärmt. Nach 24 Stunden wurden Längsschnitte von 40 µ Dicke im Kryostaten angefertigt.

Um ein Bild von der Verteilung der Endplatten im Muskel zu bekommen, wurden fortlaufend je zwei Schnitte auf Objektträger angetaut, die nächsten zwei Schnitte verworfen. So erbrachte ein Muskel je nach Größe 60 - 80 unfixierte Schnitte, von denen eine Hälfte zum Nachweis der Acetylcholinesterase an den motorischen Endplatten nach GOMORI gefärbt, die andere Hälfte zur Darstellung der Nervenendverzweigungen nach Minker versilbert wurde. Diese ursprünglich nur für formalinfixierte Schnitte vorgesehene Methode wurde durch entsprechende Modifikation nach HÖLLDOBLER erstmalig bei Kryostatschnitten angewandt.

Weitere Schnitte wurden zur HE-Färbung und zur kombinierten AChE/HE-Färbung bereitgestellt. Außerdem wurde versucht, die Calcium-Freisetzung an der Endplatte histochemisch nachzuweisen.

Erläuterungen zu den nachfolgenden Abbildungen

Abb. 2: Aufzweigung des N.ischiadicus in den N.tibialis, N.peroneus und N.cutaneus surae vor der Operation.

Abb. 3: Das freie Transplantat vom N.peroneus (links) ist an den N.tibialis angenäht.

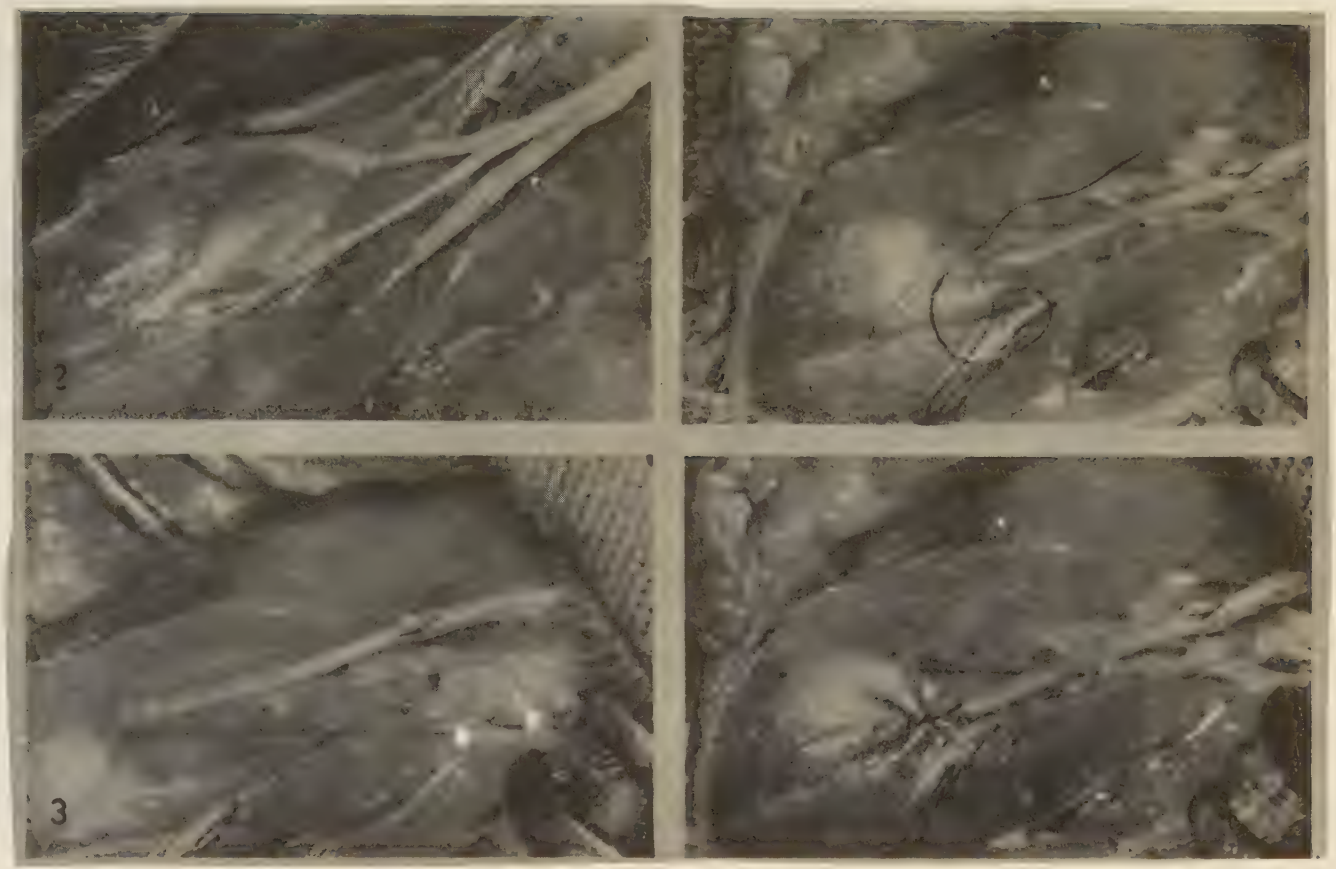
Abb. 4 + 5: Fixieren des Transplantats durch Naht der Muskelfasern.

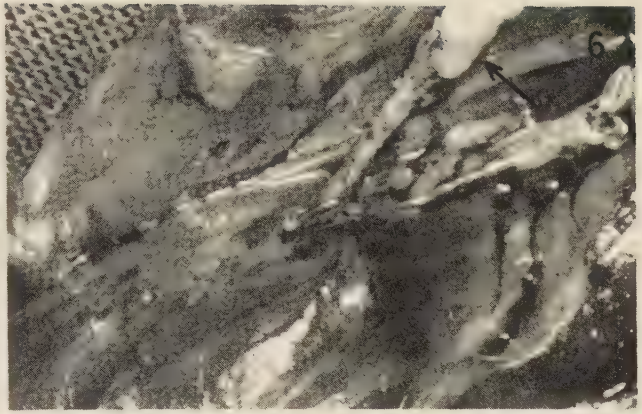
Abb. 6: Das implantierte Transplantat 5 Monate postoperativ. Spindelförmige Auftreibung der Nervennaht.

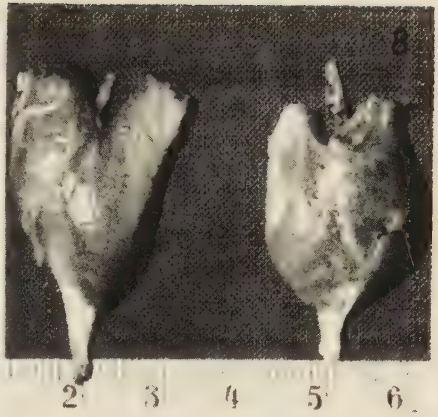
Abb. 7: Spiraliges Wachstum der Zehenkrallen infolge der Kontrakturen.

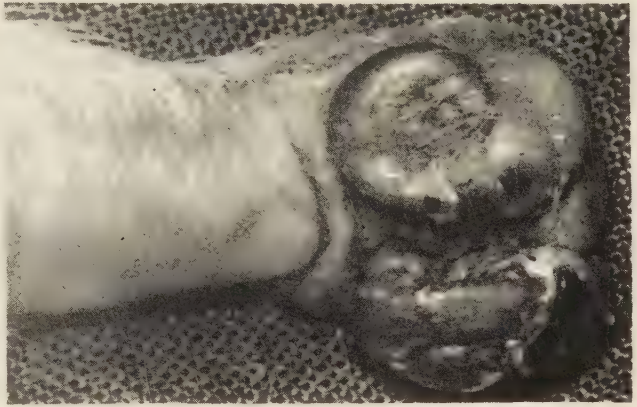
Abb. 8: Reinnervierter Gastrocnemius 5 Monate postoperativ (rechts) und Vergleichsmuskel.

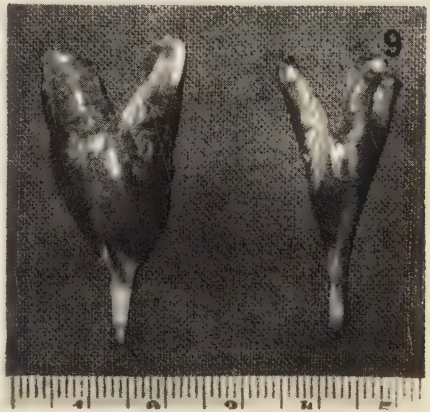
Abb. 9: Denervierter Gastrocnemius 1 1/2 Monate postoperativ (rechts) und Vergleichsmuskel.


2
3


6


8
2
3
4
5
6




9

IV. ERGEBNISSE

Aufgabe der Experimente war es, an Hand der oben genannten Operationsmethoden festzustellen,

a) ob eine Einheilung von intakten Nervenstümpfen in benachbarte Muskulatur mit großer Sicherheit gelingt und zur Ausbildung einer vollwertigen motorischen Innervation führt;

b) ob die Implantation eines dazwischengeschalteten freien, autologen Nerventransplantats zu den gleichen funktionellen Ergebnissen führt.

1.) Nach Implantation eines muskelfremden, peripheren motorischen Nerven kam es in dessen Fasern zu keinerlei makroskopisch sichtbaren Veränderungen. Die proximale Nahtstelle des freien Transplantats neigte dagegen zur spindelförmigen Auftreibung infolge Neurombildung durch aberrierende Nervenfasern. Es gelang nicht, die beiden Nervenstümpfe so exakt zu vereinigen, daß alle aussprießenden Fasern in den distalen Stumpf einwuchsen.

Der Durchmesser des Transplantats entsprach etwa dem des proximalen Tibialisstumpfs. Nachdem die Fasern die proximale Nahtstelle durchwachsen hatten, blieb dieses Größenverhältnis bestehen. Die Anzahl der Fasern sowie deren Querschnittsverteilung im Transplantat nach Regeneration wurden nicht bestimmt.

Als äußeres Zeichen für die wiederhergestellte Funktion des Muskels diente die Zunahme des Beinumfangs in Höhe der Wade. Nach einer anfänglichen Abnahme durch Muskelatrophie konnten folgende Werte gemessen werden, wobei zu berücksichtigen ist, daß alle Unterschenkelmuskeln außer dem M.gastrocnemius infolge Denervierung ausgefallen sind:
Die Tabelle enthält von den verschiedenen Messungen die jeweiligen Mittelwerte und die mittlere Streuung der Mittelwerte.

Beinumfänge zum Zeitpunkt der Auswertung (cm)							
Implantation freier Nerventransplantate				Einfache Implantation		Nerv durchtrennt	
elektrisiert		nicht elektrisiert					
op.	nicht op.	op.	nicht op.	op.	nicht op.	op.	nicht op.
5,6	4,8	6,2	6,8	5,7	5,9	4,1	5,9
5,2	5,8	5,8	5,7	6,8	6,0	3,9	5,5
5,7	4,7	6,7	6,2	5,9	5,8	4,7	6,5
6,4	6,0	6,6	6,8	4,9	4,5	4,5	6,2
6,6	6,3	6,1	5,4	6,2	6,0		
5,4	5,7	5,8	6,3	6,9	6,8		
7,3	7,4	5,5	5,5	6,9	6,9		
5,7	5,6	6,0	5,5	6,3	6,1		
5,9	6,5						
5,9	6,0						
5,4	5,7						
4,2	4,5						
Mittelwerte							
5,8	5,7	6,1	6,0	6,2	6,0	4,3	6,0
mittlere Streuung der Mittelwerte							
0,8	0,9	0,4	0,6	0,7	0,7	0,4	0,4

An Hand dieser Zusammenstellung läßt sich nur für die Nervendurchtrennung ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Vergleichsmuskeln feststellen. Dieser ergab sich mit 10 %iger Fehlerwahrscheinlichkeit nach dem Wilcoxon-Test. Die Beinumfänge nach Implantation entsprachen denen der nicht operierten Seite.

Die Wiederzunahme der Beinumfänge war mit einer Änderung der äußeren Form des Muskels verbunden. Beim Vergleich mit dem normalen M. gastrocnemius fiel eine Anschwellung in Höhe des Implantats und eine mehr kugelige Form auf (Abb. 8, rechts). Der Ausfall sämtlicher Unterschenkelmuskeln außer dem

M.gastrocnemius führte zu einer charakteristischen Spitzfußstellung, die jedoch die Bewegung der Tiere kaum einschränkte. Es fiel schwer, die Gangstörung nach einer Periode der Anpassung noch zu bemerken. Periphere Durchblutungsstörungen hatten Nekrosen der Zehenendglieder zur Folge. Der Ausfall der Sensibilität im gesamten Fußbereich verleitete die Tiere in einem Zeitraum bis zu zwei Monaten zum Autokannibalismus. Sie bissen sich selbst dabei einzelne Zehen ab. Die Krallen wuchsen durch Überwiegen der Beuger am Unterschenkel und durch Kontrakturen spiralig (Abb. 7).

2.) Sobald die aussprießenden Axone den Muskel erreicht hatten, breiteten sie sich zwischen dessen Fasern aus und konnten bis in die Tiefe verfolgt werden. Charakteristische Ausbreitungswege bildeten die Bindegewebsspalten des Perimysiums zwischen den einzelnen Muskelfaserbündeln.

Auf den versilberten Serienschnitten konnte die Verzweigung des Implantats in der Tiefe des Muskels verfolgt werden (Abb. 12). Es fand sich kein Unterschied in der Ausbreitungsart zwischen dem einfachen Implantat und der Implantation eines freien Nerventransplantats. Dagegen konnten die Verzweigungen des Originalnerven deutlich abgegrenzt werden. Während dieser bis weit in die Peripherie Bündel parallel verlaufender Fasern erkennen ließ, erfolgte beim Implantat die Aufteilung der zunächst noch wenigen Fasern schon sehr weit proximal. Infolgedessen sah man nahe den Endverzweigungen meist Einzelfasern, selten einmal Bündel mit geringer Faseranzahl (Abb. 18, 19, 22). Diese Fasern waren nicht streng parallel angeordnet, sondern umschlangen sich gegenseitig.

In der Endaufzweigung ließen sich keine Unterschiede zum ursprünglichen Nerven feststellen. Hier wie dort fanden sich die gleichen Aufteilungen der Endbäumchen, an deren Spitzen die Endplatten saßen (Abb. 20-23). Diese ließen sich gut von den ebenfalls erkennbaren Kernen der Schwannschen Zellen abgrenzen (Abb. 13, 14, 15). Die Versorgung einer Muskelfaser mit mehreren Endplatten, sogenannte Hyperneurotisation, konnte in einigen Fällen beobachtet werden (Abb. 24). Nervenfasern ohne Verbindung zum Zentrum, die sich zwischen zwei motorischen Endplatten erstreckten, stellten wohl Endanastomosen dar.

Nicht alle Muskelfasern erhielten beim Auswachsen des Implantats im Muskel neue Endplatten. Noch mehrere Monate nach der Implantation lagen zwischen den reinnervierten und funktionell intakten Muskelfasern Reste zerfallener alter Fasern, die zunächst fettig, danach bindegewebig degeneriert waren (Abb. 17). Der Anteil dieser Fasern am Gesamtmuskel betrug etwa 10 % und fiel funktionell nicht ins Gewicht.

Das entscheidende morphologische Substrat für die wiederhergestellte Funktion des Muskels bildeten die motorischen Endplatten. Diese ließen sich histochemisch durch Anfärbung der Acetylcholinesterase (AChE) nachweisen. Der Nachweis diente gleichzeitig dem Vorhandensein und der ungestörten Funktion der Endplatten, denn eine Synapse ohne Nervenverbindung setzt nur ganz geringe Mengen von Acetylcholin (ACh) frei. Infolgedessen kommt es auch dabei nicht zur Anhäufung des spaltenden Ferments, der Acetylcholinesterase.

Bei allen intakten Vergleichsmuskeln fand sich eine charakteristische Verteilung der Endplatten im Muskel. Die Endplatten lagen jeweils in der Mitte der Muskelfasern. Da der M.gastrocnemius ein gefiederter Muskel mit drei Ursprungssehnen ist, verteilen sich die Endorgane glockenförmig um die einzelnen Sehnen. Dieser Verteilung entsprach auf dem Längsschnitt eine parabelförmige Endplattenzone, die als typisch für den M.gastrocnemius anzusehen ist.

Nach der Implantation kam es zunächst zur Reinnervation der Muskelfasern in Implantatnähe. Die Anhäufung der motorischen Endplatten in diesem Gebiet war anscheinend nur vom zufällig eingeschlagenen Weg der Nervenfasern bestimmt. Dieser Endplattenhaufen war bei allen reinnervierten Muskeln nach der Nervenimplantation zu sehen. Erst später kam es zur Wiederherstellung der alten Endplattenzone, so daß jetzt nebeneinander Synapsen um das Implantat herum und in physiologischer Anordnung in der jeweiligen Mitte der Muskelfasern zu sehen waren.

Die Struktur der neuen Endplatten im Bereich der alten Endplattenzone entsprach völlig derjenigen, die die Endplatten in Implantatnähe aufwiesen und unterschied sich nicht von der Struktur normaler motorischer Endplatten. Zeigten sich bei der Silberfärbung einfache ellipsenförmige Scheiben mit zentralem Punkt, der wohl einem Nervenende entsprach, so brachte der histochemische AChE-Nachweis die Feinstrukturen zum Vorschein. Je nach Schnittrichtung stellte sich die Oberflächenvergrößerung der beiden Synapsenmembranen und das verzweigte Kanalsystem des Synapsenspalts dar (Abb. 25-30).

Die Größe der Endplatten und die Anordnung auf den Muskelfasern waren nicht von denen beim intakten Muskel zu unterscheiden. Der Zusammenhang zwischen funktioneller Endplatte und gut erhaltener Muskelfaser wurde deutlich, denn im Verlauf der degenerierten Muskelfasern ließen sich keine Endplatten nachweisen. Eine normale Struktur ließ also auf eine normale Funktion schließen.

Die Regenerationszeiten nach den einzelnen Operationstypen schienen funktionell nicht von großer Bedeutung zu sein. Histologisch ließen die Präparate keine exakte Altersbestimmung zu. Neugebildete Endplatten hatten zwar zunächst noch

die Form einzelner Bläschen, flossen aber bald zu einem einheitlichen Kanalsystem zusammen. Dieses hatte sich nach drei Monaten meistens schon ausgebildet, andererseits waren aber auch in älteren Muskeln immer noch einzelne bläschenförmige Endplatten zu sehen. Es ließ sich nicht sicher entscheiden, ob es sich dabei um echte Granula oder nur um eine Vortäuschung solcher durch ein entsprechend angeschnitenes Kanalsystem handelte.

Das Elektrisieren einer Gruppe während der Nachbehandlung hatte keinen Einfluß auf die Nervenregeneration und die Entstehung neuer Endplatten. Lediglich im bereits reinnervierten Muskel zeigte sich eine geringe Hypertrophie der Muskulatur gegenüber den unbehandelten Vergleichstieren. Diese Hypertrophie war auf den Zeitraum des Elektrisierens beschränkt und trat besonders bei den Tieren in Erscheinung, die während dieser Zeit ausgewertet wurden. Bei den anderen bildete sich der Muskel wieder auf ein normales Maß zurück und unterschied sich äußerlich nicht von den unbehandelten. Histologisch ließ sich weder eine Auswirkung auf die Nervenverzweigungen noch auf die Struktur der Endplatten nachweisen.

3.) Während im Verlauf der ersten Wochen nach der Nervenimplantation eine indirekte Reizung des Muskels über das Transplantat noch keinen Erfolg zeigte, konnten nach dem zweiten Monat in allen Fällen Muskelaktionspotentiale abgeleitet werden.

Um die physiologischen Eigenschaften der neugebildeten motorischen Endplatten wenigstens annähernd kennenzulernen, wurden an ihnen die folgenden elektrophysiologischen Größen bestimmt und mit den bekannten Normalwerten verglichen:

a) Die notwendige Reizstärke (Schwelle) für den supramaximalen Reizerfolg in der direkten und indirekten Muskelreizung.

b) Die durchschnittliche Spitzenamplitude des Summenaktionspotentials unter direkter und indirekter Muskelreizung.

c) Die mittlere Latenzzeit zwischen Reiz und Summenaktionspotential unter direkter und indirekter Muskelreizung, wobei der zweite Meßpunkt dieser Zeitbestimmung einmal an der Ablenkung aus der Nullinie, zum anderen an dem Spitzenpotential (Spike) betrachtet wurde.

d) Ferner wurde die Abhängigkeit der Potentialhöhe und der Latenzzeit von der Reizfolgefrequenz (Reizrate RR) untersucht, weil sich hier die Belastbarkeit der neuen Nerv-Muskel-Synapse am ehesten zeigen könnte.

Die tabellarische Mitteilung aller dieser elektrophysiologischen Daten soll anderenorts publiziert werden, um den Rahmen dieser morphologischen Arbeit nicht

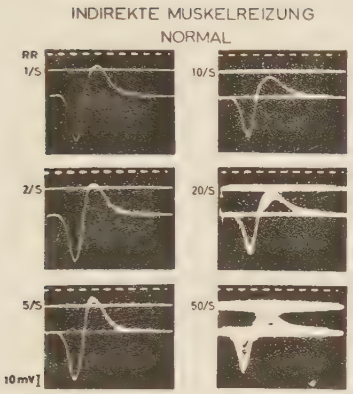
zu sprengen. Hier folgen nur die wichtigsten Befunde:

Die zur Provokation maximaler Amplituden des Summenaktionspotentials notwendige Reizspannung hatte bei direkter und indirekter Muskelreizung nach Nervenimplantation eine so starke Streuung (zwischen 0,2 und 20 Volt), daß ihre statistische Untersuchung und der Vergleich mit den Normalwerten nicht sinnvoll erscheint. Der Grund für die oft hohe Reizschwelle kann in den jeweiligen Ableitebedingungen oder in den stark schwankenden Zeitintervallen zwischen Implantation und elektrischer Reizung liegen. Im Durchschnitt war bei den operierten Tieren die optimale Reizspannung mit 3 - 5 Volt höher als bei den Kontrolltieren mit 0,5 - 1 Volt.

Die Spitzenamplitude des Summenaktionspotentials hatte eine große interindividuelle und intraindividuelle Streuung. Die mit unserer Methode (intramuskuläre Koaxialelektrode) abgeleiteten Potentiale zeigten im Vergleich der operierten Tiere mit den Kontrollen bisher keine signifikanten Unterschiede. Genauere Bestimmungen können allerdings auch nur mit Oberflächenelektroden (belly-tendon-Methode) vorgenommen werden.

Die Latenzzeiten zwischen indirektem Reiz und Beginn des Summenaktionspotentials lagen mit 2,6 msec durchweg höher als bei den Kontrolltieren mit 1,4 msec. Natürlich ist auch hier die z. T. recht kurze Einheilungszeit als Streufaktor in Rechnung zu stellen.

Erwartungsgemäß ergab sich nach Nervenimplantation bei der indirekten Muskelreizung eine Abhängigkeit der Amplituden und Latenzzeiten von der steigenden Reizfolgefrequenz, die jedoch nicht weit vom Normalverhalten abwich. Abb. 10 und 11 zeigen, daß im Einzelfall schon bei Reizraten um 20/sec die Amplitude im Sinne der Sofortdepression zurückging, bei 50/sec mit großer Regelmäßigkeit zusammenbrach, während der normale Muskel diesen Folgefrequenzen noch weitgehend standhalten konnte.



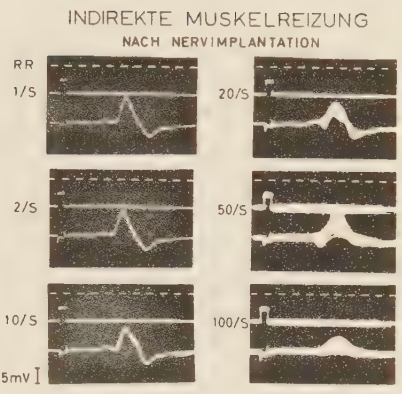


Abb. 10 und 11: Indirekte Muskelreizung am M.gastrocnemius des gesunden Meerschweinchens (10) und nach Implantation eines freien Nerventransplantats (11).
Reizung mit Rechteckimpulsen verschiedener Reizraten (RR).

Noch stärker als die Amplitude wurde jedoch die Latenzzeit vom Ansteigen der Reizrate beeinflußt: Sie vergrößerte sich oft um 1 - 2 msec für das Anheben der RR von 5/sec auf 50/sec. Eine derartige Verlängerung war in allen geprüften Fällen zu beobachten, während im gesunden Kontrollmuskel die Latenzzeit bei Anhebung der Reizrate auf 50/sec nur um weniger als 1 msec anwuchs. Selbstverständlich sind die Absolutwerte auch z. T. von der Methodik verdeckt; z. B. wird der flache Anstieg eines Potentials eine Festlegung des Abgangs aus der Nullinie erschweren. Wichtiger ist der Vergleich der relativen Änderung mit der Steigerung der Reizraten.

Bei der Bestimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften fand sich, ebenso wie bei der histologischen Auswertung, kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Implantation eines Nerven und der Implantation eines freien Nerventransplantats.

4.) Einen krassen Gegensatz zu allen bisherigen Ergebnissen bildete die Muskelgruppe, bei der dem Muskel jegliche Nervenversorgung genommen worden war, ohne ihm durch ein Implantat die Möglichkeit zur Regeneration zu geben. Diese Muskeln blieben nicht im Anfangsstadium der Atrophie stehen, das alle anderen auch hatten durchlaufen müssen, sondern boten schon nach 14 Tagen und drei Wochen das Bild vollständiger Atrophie (Abb. 9, rechts). Äußerlich zeigte sich diese in einer Verringerung der Beinumfänge gegenüber der normalen Seite und einem im Vergleich zum normalen Präparat stark geschrumpften Muskel.

Die Endplatten hatten in dieser kurzen Zeit schon ihre normale Struktur verloren und lagen als kurze, wurmförmige Gebilde zwischen den Muskelfasern. Die HE-Färbung zeigte eine starke relative Kernzunahme als Folge der Gewebsschrumpfung.

Erläuterungen zu den histologischen Abbildungen

HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung
S = Silberfärbung modifiziert nach MINKER
AChE = Acetylcholinesterasedarstellung nach GOMORI

Abb. 12: Auswachsende Nervenfasern an der Implantationsstelle, 45fach, S.

Abb. 13: Ausschnitt aus Abb. 12: Nervenendbäumchen mit Endplatten, 460fach, S.

Abb. 14+15: Nervenendäste. Schwannsche Zellkerne dunkel, Synapsen heller mit zentralem Punkt, 460fach, S.

Abb. 16: Aus der reinnervierten Endplattenzone, Nervenverzweigung und Endplatten, 45fach, HE/AChE.

Abb. 17: Degenerierte Muskelfaser inmitten reinnervierter Muskulatur, 45fach, HE.

Abb. 18: Nervenendast mit Schwannschen Zellen und Synapsen, 150fach, S.

Abb. 19: Nervenendaufzweigung mit Synapsen, 150fach. S.

Abb. 20: Dasselbe in AChE-Färbung, 185fach.

Abb. 21: Dasselbe in HE/AChE-Färbung, 115fach.

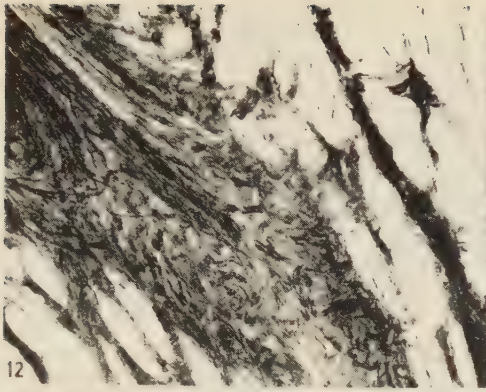
Abb. 22: Nervenäste mit Kontakt zur Muskelfaser, 185fach, S.

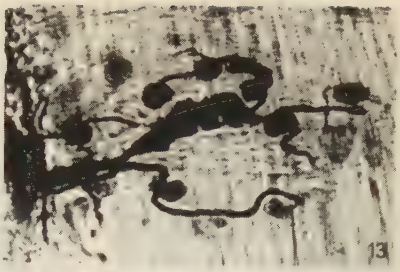
Abb. 23: Ausschnitt aus der reinnervierten Endplattenzone, 185fach, AChE.

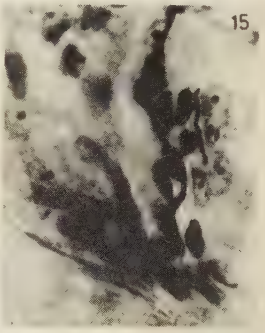
Abb. 24: Zwei Muskelfasern mit je zwei Synapsen (Hyperneurotisation), 290fach, AChE.

Abb. 25-30: Verzweigtes Schlauchsystem der Synapsen mit Doppelmembranen und deutlicher Oberflächenvergrößerung, 460fach, AChE.

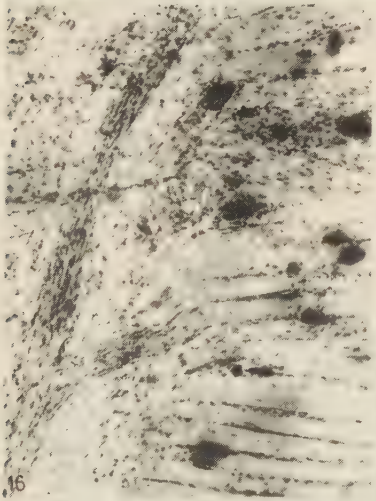
Abb. 29: Einmündung des Nerven in die Endplatte, 460fach, AChE.

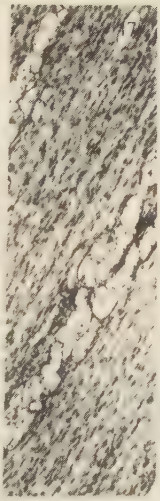

12


13


15

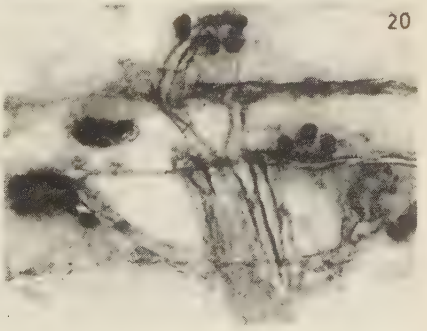
14

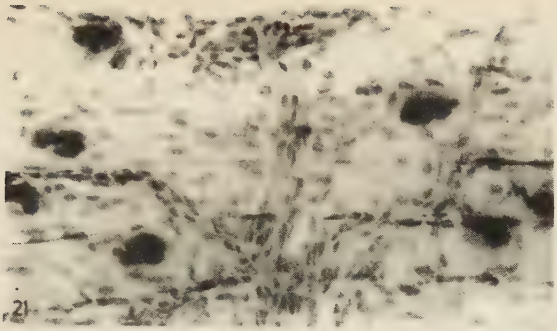

16

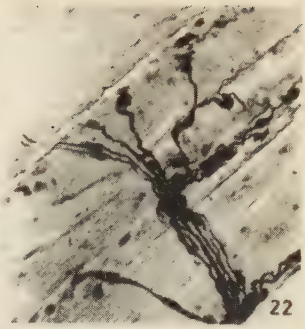


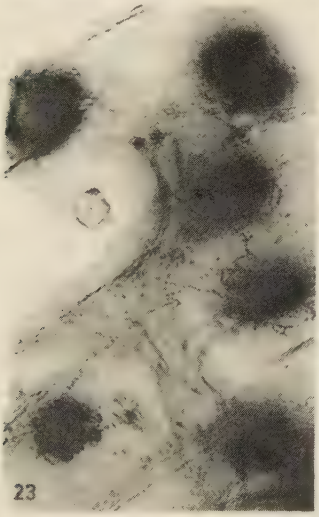
18

19

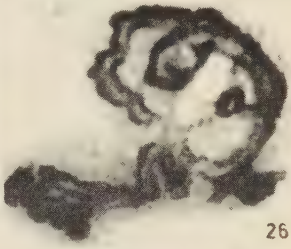

20

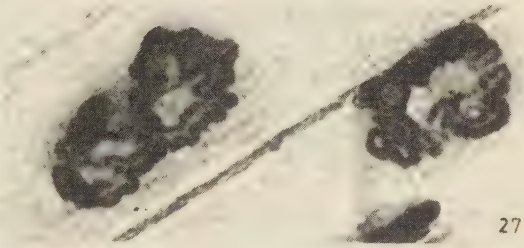

21

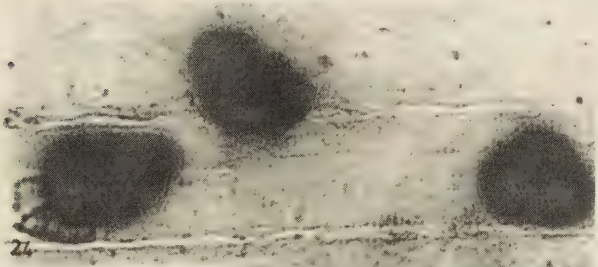

22

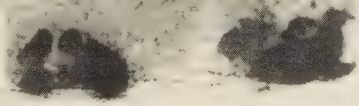

23

25

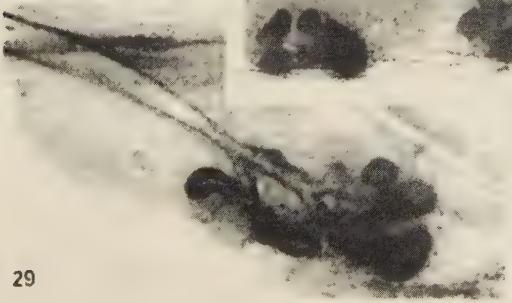

26

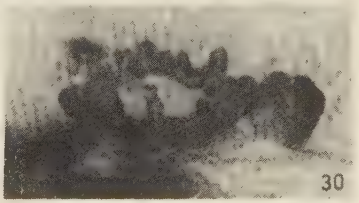

27


24



28


29


30

V. DISKUSSION

Es sind bislang zahlreiche Versuche unternommen worden, die unterbrochene Kontinuität eines Nerven wiederherzustellen oder abgerissenen Nerv-Muskel-Kontakt neu zu schaffen. Von der einfachen Nervennaht mit verschiedenen Methoden und Hilfsmitteln über die Nerventransplantation, die Implantation intakter Nerven in unversorgte Muskeln (ELSBERG) bis hin zur Replantation einer ganzen Extremität (MAYER, EICKEN und NASBETH) haben die Experimente gereicht. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, einen denervierten Muskel wieder motorisch zu versorgen und dabei gleichzeitig einen Substanzverlust des Nerven zu ersetzen.

Zunächst stellte sich die Frage, welcher Spendernerv in Betracht komme. ELSBERG war noch der Ansicht, daß unter gleichen Bedingungen der muskeleigene Nerv immer einem fremden Transplantat zuvorkommt, wenn es darum geht, den Kontakt zum Muskel wiederherzustellen. FENG, WU und YANG fanden auch diese ausgeprägte Selektivität in der Reinnervation. Dagegen billigten WEISS und HOAG dem muskeleigenen Nerven keinen Vorzug vor fremden Nervenfasern zu. BERNSTEIN und GUTH zeigten an Hand der Hyperneurotisation, daß keine Selektivität bestehen könne, und GUTH wies auf den Gegensatz zum vegetativen Nervensystem hin, dessen Fasern bestimmte Muskeln und Organe bevorzugt innervieren.

Wichtiger als die Frage "eigener oder fremder Nerv" scheint die elektrophysiologische Anpassung zu sein. Es empfiehlt sich, den Spendernerven nach seinen Faserqualitäten auszuwählen. Die Impulsrate und -amplitude sollten weitgehend denen der ursprünglichen Innervation entsprechen. Im Gegensatz zu anderen, funktionsorientierten Untersuchungen (WIGAND u. a., FEX) spielte dieses Problem hier keine Rolle, da der N.tibialis zur proximalen Anschaltung beibehalten wurde.

Dem Maß und der Verteilung der Faserquerschnitte im Transplantat kommt weniger Bedeutung zu, da es nur als Leitbahn für die aussprießenden Axone dient und diese nicht einmal in allen Fällen innerhalb der Schwannschen Scheiden peripherwärts auswachsen (KRÜCKE). Bei seiner Auswahl ist aber auf einen hinreichenden Durchmesser zu achten. Dieser kann notfalls durch Verwendung mehrerer dünner Faserbündel erreicht werden. Das Transplantat sollte auch nicht zu lang gewählt werden, damit die auswachsenden Fasern nicht in der Peripherie fibröses Bindegewebe in Form der Büngnerschen Bänder vorfinden. Damit wäre der Regeneration zusätzlich ein mechanisches Hindernis entgegengesetzt.

In unserem Fall erfüllte das frische Autotransplantat vom N.peroneus mit etwa gleichem Durchmesser wie der Spendernerv und einer Länge von 1,5 - 2 cm diese Forderungen. Ob der Länge des freien Transplantats von 2 cm im Tierversuch beim Menschen ein Transplantat von ca. 10 cm entspricht, bleibt zunächst noch abzuwarten. Die erste Frage, ob durch Implantation eines muskelfremden Nerven oder eines freien Nerventransplantats die Reinnervierung mit großer Sicherheit gelingt, wurde von dem Experiment am M.gastrocnemius eindeutig positiv beantwortet. Bei allen 43 Implantationen gelang es, die Bildung neuer motorischer Endplatten im Muskel nachzuweisen.

Da die Denervierung und die Neuimplantation zeitlich zusammenfielen, durchliefen alle Muskeln in der vorliegenden Untersuchung nur eine geringe Atrophie. Es stellt sich jedoch die Frage, wie weit diese Atrophie gehen, d. h. wie lange die Impulsunterbrechung maximal dauern darf, um eine Reinnervation noch erfolgversprechend und sinnvoll erscheinen zu lassen. Dies soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Umgekehrt ist es nach FORT hingegen möglich, ein Nervenimplantat wochenlang reaktionslos im intakten Muskel liegen zu lassen und erst zum Zeitpunkt der Denervierung die Voraussetzung für die Reinnervation der Muskelfasern zu schaffen.

Um jeglicher Atrophie der Muskeln entgegenzuwirken, und um gleichzeitig ein stärkeres Auswachsen der Nervenfasern zu erzielen, wurde ein Teil der Tiere mit Stromstößen behandelt von einer Spannung, die maximale Kontraktionen ergab. GUTH, BROWN und WATSON haben mit der gleichen Therapie eine Verzögerung des Proteinverlustes messen konnen. Einen Effekt auf die AChE-Freisetzung fanden sie allerdings nicht. Muskelkontraktion scheint keinerlei Einfluß auf die Regulation der AChE-Aktivität zu haben. FORT konnte keine Auswirkungen der Muskelkontraktion auf die Hyperneurotisation durch fremde Nerven feststellen. Auch bei unseren Versuchstieren zeigte sich außer einer leichten Hypertrophie zum Zeitpunkt der Behandlung, die nach einigen Wochen wieder zurückging, kein Erfolg bei dieser Therapie. Elektrophysiologisch und histochemisch verhielten sich behandelte und unbehandelte Muskeln völlig gleich. Der Nerv hatte vermutlich in allen Fällen zu Beginn der Behandlung schon Anschluß an die Muskelfasern gefunden und wurde in seinem Wachstum nicht beeinflußt.

GUTMANN und JAKOUBEK haben auf den negativen Einfluß des intensiven Trainings durch Schwimmen bei der Ausreifung der Nervenfasern hingewiesen. Im Zeitpunkt des Wiedereinsetzens der Motorik nach Nervenquetschung bestand bei ihnen kein Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Versuchstieren. Wir ließen deshalb alle Tiere sich frei im Stall gewegen und betrieben nach Abheilen der Operationswunden keine weitere Nachbehandlung.

Auch auf die Verwendung von Nervenwuchsfaktoren wie ß-Hydroxyglutarsäuredinitril (BAMMER) und Dinitrophenol (SCHMID) oder einer neuerdings von SCOTT und LIU aus den Speicheldrüsen von Mäusen isolierten proteinhaltigen Substanz wurde trotz der Erfolge im Cornealtest aus technischen Gründen verzichtet.

Das erste Hindernis trat den Fasern beim Auswachsen an der proximalen Nahtstelle in den Weg. In allen Fällen kam es zu der auch von TERRY und HARKINS beobachteten spindelförmigen Auftreibung, die durch aberrierende Fasern in Form eines Neuroms entsteht. Dies hat einen Verlust an Leitungsbahnen zur Folge, der nach ZELENA und HNIK bis zu 40 % betragen kann. Es ist anzunehmen, daß sich auch in unserem Fall das Querschnittsdiagramm in der von GUTMANN und SANDERS, SANDERS, sowie von EVANS und MURRAY angegebenen Weise geändert hat und es zu einer Zunahme der dünnen Fasern gekommen ist, die nach Kontakt in der Peripherie schlagartig an Durchmesser zunehmen. Damit läßt schon die alleinige Untersuchung des versorgenden neuen Nerven gewisse Rückschlüsse auf den Stand der Reinnervation zu.

Da der Kontakt nicht an allen Fasern zur gleichen Zeit und nicht im ganzen Muskel im gleichen Umfang stattfand, änderte sich die äußere Form des Muskels. Durch Hypertrophie der Muskelfasern in Implantatnähe erhielt er zunächst eine mehr kugelige Form gegenüber der schlanken Kontur der Vergleichsseite. Eine entsprechende Gewichtszunahme bis zu 30 % des Ausgangswertes sah FEX auch bei Implantation von Nerven in normal innervierte Muskulatur. Ihre Ursache liegt in der trophischen Funktion des Nerven und nicht in der Ausbildung neuer motorischer Endplatten begründet. Bei der mindestens dreimonatigen Dauer nach der Operation war die erste Phase der Atrophie schon überwunden, so daß sich bei der Auswertung in allen Fällen ein gut entwickelter Muskel zum Teil mit Zeichen der Hypertrophie zeigte.

Um die Frage nach den Voraussetzungen für das Entstehen neuer motorischer Endplatten zu beantworten, war es zunächst notwendig, zu prüfen, ob das Implantat verantwortlich für den Anstieg des Muskelgewichts und die Zunahme der AChE-Freisetzung war. Zu diesem Zweck wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von GUTH, ZALEWSKI und BROWN bei vier Tieren sämtliche Nervenleitungen in der Kniekehle unterbrochen. Bereits nach 14 Tagen waren deutliche Denervierungsfolgen zu sehen und die Atrophie an der Abnahme der Beinumfänge zu messen. Histologisch ließen sich auf den degenerierten Muskelfasern keine AChE-haltigen Endplatten mehr nachweisen. Damit hat sich das Nervenimplantat als die wesentliche Ursache einer Reinnervation erwiesen.

Beim stumpfen Auseinanderdrängen der Muskelfasern an der Implantatstelle kam es hier zu Verletzungen. In dieser Region bildeten sich neue Endplatten in unregelmäßiger Anordnung um den Nerven. GWYN und AITKEN stellten sich bei den gleichen Befunden die Frage, ob die mechanische Verletzung des Muskels ein notwendiger Faktor für die Entstehung neuer motorischer Endplatten bildet, wie es zuvor von MILEDI behauptet worden war. Auf Grund ihrer Operationstechnik ohne lokale Verletzung von Muskelfasern mußten sie dieses jedoch ablehnen. Außerdem läßt sich auf diese Weise nicht das weitere Auswachsen von Nervenfasern zwischen die Muskelbündel und die Reinnervation tiefer gelegener, nicht verletzter Anteile des Muskels erklären.

Die Ausbildung von Synapsen in Implantatnähe kann als erste Reaktion beim Zusammentreffen von Nerv und Muskel angesehen werden; die anschließende koordinierte Ausbreitung des Nerven im Muskel bleibt rätselhaft. Daß es sich hierbei zunächst um einen Vorstoß einzelner Fasern handelte, beweisen die histologischen Aufnahmen, die nicht den parallelen Verlauf ganzer Faserbündel wie im normalen Präparat zeigen (Abb. 12). Auch hier drängte sich wieder der Vergleich mit der embryonalen Entwicklungsperiode auf, in der sich erstmalig Nervengewebe im Muskel ausbreitet.

Die wesentliche Voraussetzung für das Einwachsen des Implantats und die Wiederherstellung einer annähernd physiologischen Endplattenzone muß in der Denervierung des Muskelgewebes liegen. Die erste Folge der Durchschneidung des motorischen Nerven ist die von SCHWARZACHER beschriebene Abnahme der spezifischen AChE-Aktivität. Im Gegensatz dazu bleibt die unspezifische ChE während der Degeneration bestehen, da sie an die nicht betroffenen Nervenfaserhüllen gebunden ist. Die von ROHR-HAGEDORN beobachtete Diffusion des Ferments aus der geschädigten Endplatte hinaus in die umgebende Muskulatur ließ sich auf den histochemisch gefärbten Schnitten bestätigen. Allerdings schien schon bald nach der Durchschneidung eine Änderung der Endplattenstruktur einzusetzen, die von der Schrumpfung der Muskelfasern begünstigt zu sein schien. Eine Überempfindlichkeit gegenüber der normalen Transmittersubstanz in dieser Phase wurde nicht nachgewiesen, doch ist sie als Voraussetzung zur Reinnervation sicher nötig gewesen.

Eine ähnliche Atrophie wie durch Denervierung konnten GUTH, BROWN und WATSON durch Tenotomie erzielen. In diesem Fall hört zwar auch die durch Nervenimpuls gesteuerte AChE-Freisetzung auf, die unwillkürliche Transmitterfreisetzung wird aber im Gegensatz zur Nervendurchtrennung nicht unterbrochen. Diese Atrophie scheint anderer Art zu sein, denn die ChE-Aktivität bleibt voll erhalten. Sie läßt sich demnach nicht mit unseren Ergebnissen vergleichen und

auch nicht durch Nervenimplantation aufheben.

Untersuchte man das Verhalten der Muskeln nach der Implantation, die nach vorausgegangener Denervierung durchgeführt wurde, so ließen sich deutlich zwei Phasen unterscheiden, nämlich zunächst die eben beschriebene atrophische und die anschließende regenerative Phase. Die erste zeigte nur die Denervierungsfolgen, ohne schon einen Einfluß des Implantats auf den Muskel aufzuweisen. Hier spielte die Unterbrechung der trophischen Funktion des Nerven die entscheidende Rolle. Die Stoffwechseleigenschaften der Muskelfaser sind offensichtlich vom Neuron reguliert und unterliegen bei Verlust der Innervation einer Störung.

HAJEK, GUTMANN und SYROVY haben vermutet, daß eine chemische Substanz im Nerven den Abbau der Proteine steuert. Ein Anstieg der messbaren proteolytischen Aktivität im denervierten Muskel hing mit dem Verlust dieser Substanz zusammen, die vom Nerven nachgeliefert wird und nach Denervierung bald versiegt. YELLIN konnte histochemisch auf Muskelquerschnitten bestimmte Mosaikmuster zeigen, die einer spezifischen Enzymaktivität entsprachen. Dieses spezifische Muster ließ sich durch Denervierung beeinflussen. Damit zeigt sich erneut die weitgehende Abhängigkeit des Muskels von seiner Nervenversorgung.

Den gleichen Effekt wie nach motorischer Denervierung kann man auch durch pharmakologische Beeinflussung des Nerven und der Endplatte erreichen. HOFFMANN, THESLEFF und ZELENA schalteten auf diese Weise die neuromuskuläre Übertragung aus und sahen keinerlei denerative Veränderungen an den Nervenendigungen. Trotzdem wurden die Muskelfasern atrophisch und zeigten die für diesen Zustand typische, spontane elektrische Aktivität in Form von Fibrillieren.

Bei unseren Versuchstieren dauerte diese erste Phase vom Zeitpunkt der Operation bis zur Ankunft der regenerierenden Axone im Muskel an. Bei einer Transplantatlänge von 1,5 - 2 cm mußten wir etwa 14 Tage dafür berechnen. In diesem Zeitraum vollzogen sich an der Muskelfaseroberfläche wohl diejenigen Veränderungen, welche die bisher gegen jegliche zusätzliche Innervation refraktären Membranen in einen ACh-sensiblen Zustand versetzten.

In der zweiten, regenerativen Phase ging die Atrophie derjenigen Fasern zurück, die Kontakt mit dem Nerven bekommen hatten. Das gelang zu einem sehr hohen Prozentsatz. Der Rest lag degenerierend zwischen den intakten Fasern und blieb histologisch noch lange nachweisbar. Die Zunahme der Beinumfänge demonstrierte äußerlich sichtbar den Übergang in diese zweite Phase.

Die beiden Grundvoraussetzungen für jede Reinnervation von quergestreifter Muskulatur sind also erstens der Verlust der eigenen Innervation - auf welche Weise auch immer - mit der Folge der anschließenden Ausbreitung der ACh-sensiblen Zone über die ganze Muskelfaser und zweitens die Bereitstellung neuer Nervenfasern, die in der Lage sind, die Ausbildung neuer motorischer Endplatten zu induzieren.

Die histologischen Untersuchungen lassen genaue Aussagen über Aussehen, Verteilung im Muskel und Eigenschaften der neugebildeten Endplatten zu. So schien es in unseren Präparaten in der Regel nicht der Fall zu sein, daß alte Endplatten wieder reinnerviert wurden. Dafür sprechen die vielen Fasern mit mehr als einer Synapse, deren Anteil am Gesamtmuskel allerdings nicht zahlenmäßig ermittelt wurde (Abb. 24). Diese auch von GUTH und ZALEWSKY beschriebene Zunahme der Hyperneurotisation, d. h. der vorhandenen Muskelfasern mit mehr als einer Nervenzuleitung von 3,3 % im normalen Muskel auf 38 % nach der Implantation, beweist diese Annahme.

Die Endplatten ließen sich auf zwei verschiedene Arten darstellen. Durch den histochemischen Nachweis der AChE mit der GOMORI-Färbung, die auch von GEREBTZOFF aufgegriffen und in vielen Anwendungsbereichen beschrieben worden ist, kamen die Feinstrukturen des Synapsenspalts und die Oberflächenvergrößerungen seiner beiden Membranen deutlich zum Vorschein (Abb. 25-30). Eine zeitliche Differenzierung der Entwicklungsstadien, wie sie GWYN und AITKEN mitgeteilt haben, war uns nicht möglich.

Es ließen sich jedoch einzelne typische Formen unterscheiden. So schien zunächst eine mehr granuläre Form vorzuliegen, die durch das Zusammenfließen einzelner Bläschen zu einem verzweigten Kanalsystem wurde. Ähnliche Beobachtungen mögen KÜHNE 1887 verleitet haben, von Geweihen zu sprechen und einzelne Grundformen in der aufsteigenden Tierreihe herauszuarbeiten.

Alle Entwicklungsstufen waren in jedem Muskel nebeneinander zu sehen. Das spricht für eine fortlaufende Teilung der Nervenendverzweigungen im Beobachtungszeitraum und eine anhaltende Neubildung von Endplatten. Allerdings konnte trotz der Schichtdicke von 40 u nicht in jedem Fall sicher entschieden werden, ob es sich um eine granuläre Endplatte handelte oder um einen Querschnitt durch das Kanalsystem, bei dem die Schläuche sich als kleine Kreise darstellten. In günstigen Fällen konnte die Verbindung des Nerven mit diesem System angeschnitten sein, der rohrförmig einmündete und eine Vorstellung von den humoralen Mechanismen vermittelte, die sich an der Endplatte abspielen (Abb. 29).

Daneben stellten sich in einigen Schnitten die Muskelansätze an den Zentralsehnen mit der AChE-Färbung positiv dar. Obwohl sich die Nervenfasern gern längs dieser Sehnen ausbreiten, konnte es sich nicht um Endplatten, sondern nur um Artefakte handeln.

Durch die zweite, ebenfalls von vielen Autoren benutzte Silberfärbung - in unserem Fall nach MINKER - ließ sich der Verlauf des Nerven von der Implantationsstelle bis zu seinen Endverzweigungen verfolgen. Dabei konnte man die Endplatten durch ihre helle Darstellung in Scheibenform mit zentralem Punkt deutlich von den dunkleren Schwannschen Zellkernen unterscheiden (Abb. 15).

Die von GWYN und AITKEN angegebene Cholinesterasefärbung mit Gegenfärbung nach BIELSCHOWSKY-GROS ergab keine befriedigenden Resultate, erwies sich aber auch als überflüssig, da bei einfacher Versilberung die Endplatten schon deutlich hervortraten.

Die vermehrte Calcium-Freisetzung an der postsynaptischen Membran, die CSILIK und SAVAY nach supramaximaler Reizung und Injektion von Anticholinesterasen beobachtet hatten und die im histologischen Bild zu charakteristischen Granulationen geführt hatte, veranlaßte uns, die Endplatten auch durch Ca-Nachweis darzustellen. Diese Methode erwies sich jedoch als unbrauchbar und bot keinen Ersatz für die histochemische AChE-Darstellung.

Um gleichzeitig ein Bild vom Zustand der Muskulatur zu erhalten, eignete sich eine HE-Färbung, deren Verträglichkeit mit der AChE-Darstellung ARNOLD bestätigt hat. Damit ließ sich erneut der Zusammenhang zwischen intakter Endplatte und funktioneller Muskelfaser zeigen.

Wenn auch das Hauptgewicht dieser Untersuchung auf dem mikroskopischen Nachweis einer annähernd physiologischen Wiederherstellung der Nerv-Muskel-Kontakte beruht, so wurden darüber hinaus auch Ergebnisse durch elektrische Reizung der Muskeln über den zuführenden Nerven und Ableitung der Summenaktionspotentiale gewonnen. Gegenstand dieser Bemühungen konnte nicht die Klärung der Mikrovorgänge an der Synapse sein, sondern eine Orientierung über deren Gesamtverhalten im Reizversuch. Hier standen die Verminderung der Fusionsrate und die Verlängerung der Latenzzeit durch Erhöhung der Reizgabe im Vordergrund.

Nimmt man als gegeben hin, daß sich die Erregungsabläufe in der reinnervierten Muskelfaser normal vollziehen - Zweifel daran sind in der mir bekannten Literatur nicht aufgetaucht -, so kommen mindestens drei Faktoren in Betracht, die eine Veränderung der elektrischen Abläufe im Reizversuch nach Implantation bewirken können:

Erstens die Verlangsamung der Nervenleitungsgeschwindigkeit, die nach STRUPPLER u. a. auf einer Vermehrung der Schnürringe pro mm des regenerierten Nervenstücks sowie auf einer verminderten Markscheidendicke beruht. CRAGG und THOMAS fanden die Leitungsgeschwindigkeit schon nach Quetschung des Nerven auf 75 % des Ausgangswertes reduziert. Diese Abnahme ist aber wohl nicht nur auf das Transplantat beschränkt, denn KIRALY und KRNJEVIC beobachteten auch im zentralen Stumpf einen Abfall der Leitung von Impulsen hoher Frequenz, der nach Ausbildung peripherer Verbindungen zum Muskel teilweise reversibel zu sein schien. Die sprunghafte Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit, die nach Ausbildung des Nerv-Muskel-Kontakts auftritt, konnten wir nicht beobachten, da wir erst nach dem Entstehen neuer Endplatten abgeleitet haben.
Zweitens kommt eine mögliche Herabsetzung der Leitungsgeschwindigkeit in den Terminalaufzweigungen des regenerierten Nerven, die z. B. für das myasthenische Syndrom von PRESWICK gefordert wurde, und drittens kommen Störungen im Mechanismus der transsynaptischen ACh-Passage in Frage. Tatsächlich haben die auf den Seiten 19 - 22 geschilderten Resultate gezeigt, daß durch Nervenimplantation in den denervierten Muskel eine vollwertige Nerv-Muskel-Verbindung zustande kommt, die die Nervenerregung nur geringfügig verzögert überträgt und zur Verschmelzung tetanischer Reize nur wenig kleinere Impulsfolgefrequenzen benötigt als die normale Endplatte.

Abschließend sei noch die Frage nach der Bewegungskoordination reinnervierter Muskeln gestellt. Wenn auch in unserem Fall das Transplantat, sei es nun ein benachbarter Nerv mit erhaltener Verbindung zum Zentrum oder ein freies autologes Transplantat, in der Lage war, Kontakt zum Muskel herzustellen, so bleibt weiterhin offen, inwieweit damit die spezifische Gesamtfunktion wieder erreicht werden konnte. Bisher gelang anschließend immer nur eine Messung der groben Muskelkraft (FEX, GUTH), aber fein abgestufte Bewegungen ließen sich nicht erzeugen. Wegen des Ausfalls sämtlicher Unterschenkelmuskeln ließen auch unsere Versuchstiere keine genaue Analyse der Gangstörungen zu. Diese wurden jedoch gut kompensiert und fielen wenig ins Auge.

Nach der oben beschriebenen trophischen Funktion, die dem Nerven zukommt, liegt es jedoch nahe, daß sich mit Änderung der Innervation auch einige muskelspezifische Eigenschaften ändern. Es sei noch einmal auf das von YELLIN beschriebene Mosaikmuster der Enzyme hingewiesen, das als Kriterium für einen bestimmten Muskel gelten kann. Der hohe Anteil an Fasern einer bestimmten Enzymaktivität charakterisiert den Muskel als schnell oder langsam. Gerade diese physiologischen Eigenschaften ließen sich durch gekreuzte Innervation

austauschen. Das wäre in der Praxis eine unerwünschte Nebenwirkung, denn jede Nervenimplantation soll die Funktion des Muskels weitgehend normalisieren, d. h. den ursprünglichen Zustand wieder herstellen. Allerdings bewiesen die Versuche von FENG, WU und YANG das Gegenteil. Bei ihnen brachte die Änderung der Innervation keine Änderung des Kontraktionstyps mit sich.

Die Gruppen histochemisch gleicher Muskelfasern lassen auf motorische Einheiten, gebildet durch kollaterales Aussprießen eines Neurons, schließen (YELLIN). Eine optimale Reinnervation müßte die Zahl und, was noch wichtiger ist, die Größe der motorischen Einheiten im Muskel erhalten, denn von deren Größe ist die Feinabstufung willkürlicher Bewegungen abhängig.

Diesem Zweck dienen auch die Muskelrezeptoren, die bei der Regeneration anscheinend nicht wieder gebildet werden können. ZELENA und HNIK fanden eine geringe Abnahme der sensiblen Nervenfasern; die spezifischen Rezeptoren fielen dagegen praktisch ganz aus. Zu sehen waren lediglich zahlreiche freie Nervenendigungen. Dieses Ergebnis wurde von KRÜCKE bestätigt. Mit unseren Färbungen war es nicht möglich, Muskelspindeln zu zeigen. Die Frage bleibt offen, wieweit freie Nervenendigungen deren Funktion übernehmen können. Da jedoch nach Amputation und sofortiger Replantation die Extremitäten gebrauchsfähig blieben (MAYER, EICKEN und NASBETH), müssen sich die Reflexbahnen wieder reorganisiert und damit auch funktionstüchtige Rezeptoren ausgebildet haben.

Am Modell des M.gastrocnemius beim Meerschweinchen konnte bewiesen werden, daß es möglich ist, einen denervierten Muskel mit einem Spendernerven über ein freies Transplantat reproduzierbar mit großer Sicherheit zu reinnervieren. Entsprechende klinisch-chirurgische Anwendungen beim Menschen sind bereits unternommen und haben zu ersten Ergebnissen geführt (FEX, WIGAND u. a.). Vielleicht kann diese Methode in Zukunft dazu dienen, wichtige Muskeln zu erhalten, deren versorgender Nerv durch Verletzung oder Operationsfolgen unbrauchbar geworden ist. Dadurch könnte der Ausfall eines noch funktionstüchtigen Muskels vermieden werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Bei 47 Meerschweinchen wurden folgende Operationen durchgeführt:

a) Durchtrennung des N.tibialis in der Kniekehle und Implantation des mobilisierten N.peroneus in den M.gastrocnemius. (10 Tiere)

b) Durchtrennung des N.tibialis in der Kniekehle und Resektion eines Stücks vom N.peroneus. Annähen des Transplantats an den proximalen Tibialisstumpf und Implantation in den M.gastrocnemius. (33 Tiere)

c) Durchtrennung und Resektion aller Nerven in der Kniekehle. (4 Tiere)

Bei einem Teil der Tiere wurden jeweils vier Wochen nach der Operation elektrische perkutane Reizungen mit Impulsserien ausgeführt. Das Elektrisieren erstreckte sich bei täglicher Anwendung über 2 - 5 Monate.

3 - 12 Monate nach der Operation wurden die Tiere elektrophysiologisch geprüft und anschließend getötet. Die Beinumfänge hatten bei a) und b) leicht zugenommen. Bei c) wiesen die Muskeln eine deutliche Atrophie auf, die Beinumfänge waren wesentlich zurückgegangen und die Endplatten zeigten degenerative Veränderungen. Durch indirekte Reizung des N.ischiadicus wurde der M.gastrocnemius zur Kontraktion gebracht und die Muskelaktionspotentiale abgeleitet. Anschließend wurden die Muskeln herauspräpariert und nach verschiedenen Methoden gefärbt.

Die Implantate waren bei a) und b) in allen Fällen eingeheilt. Indirekte Reizung mit geeigneter Reizstärke führte immer zur Kontraktion des Muskels. Die Summenaktionspotentiale wiesen im Vergleich zum präoperativen Verhalten einige Veränderungen auf.

In allen Fällen hatten sich bei a) und b) neue Endplatten in der Umgebung des Implantats und in der alten Endplattenzone gebildet. Diese Synapsen waren von denen in normalen Vergleichsmuskeln nicht zu unterscheiden. Das willkürliche Muskelspiel der wiederbelebten Muskulatur konnte nicht qualitativ beurteilt werden, da alle übrigen Unterschenkelmuskeln durch Denervation ausgefallen waren.

Die eigenen Ergebnisse, deren verschiedene Aspekte mit einschlägigen Angaben in der Literatur verglichen wurden, lassen den Schluß zu, daß Nervenimplantation in denervierte quergestreifte Muskulatur mit großer Sicherheit gelingt und daß auch bei Überwindung größerer Nervendefekte die Einpflanzung freier Nerventransplantate in die gelähmte Muskulatur für die Wiederherstellung einer geordneten Willkürmotorik aussichtsreich ist.

VII. LITERATUR

1. AITKEN, J.T.: Growth of nerve implants in voluntary muscle
J. Anat. 84, 38 - 49 (1950)

2. ÄNGGARD, L., D. OTTOSON: Observations on the functional development of the neuromuscular apparatus in the fetal sheep
Exp. Neurol. 7, 294 - 304 (1963)

3. ARNOLD, M.: Histochemie
Springer, (1968)

4. BAMMER, H., V. MARINI: Über die regenerationsfördernde Wirkung von ß-Hydroxyglutarsäuredinitril im Cornealtest
Pflügers Archiv 257, 255 - 258 (1953)

5. BERNSTEIN, J.J., L. GUTH: Nonselectivity in establishment of neuromuscular connections following nerve regeneration in the rat
Exp. Neurol. 4, 262 - 275 (1960)

6. BIRKS, R., B. KATZ, R. MILEDI: Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction in the course of a nerve degeneration
J. Physiol. 150, 145 - 168 (1960)

7. CAUSEY, C., C.J. STRATMANN: The spread of failure of conduction in degenerating mammalian nerve
J. Physiol. 121, 215 - 223 (1953)

8. CRAGG, B.G., P.K. THOMAS: The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres
J. Physiol. 171, 164 - 175 (1964)

9. CSILIK, B., G. SAVAY: The effect of nerve degeneration and regeneration on the calcium release in the postjunctional cytoplasma of the motor endplate
Acta physiol. Acad. Sci. hung. 26, 337 - 342 (1965)

10. DRACHMAN, D.B.: The developing motor endplate, pharmacological studies in the chick embryo
J. Physiol. 169, 707 - 712 (1963)

11. ELSBERG, C.A.: Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotisation of paralysed muscles by their own and foreign nerves
Science 45, 318 - 320 (1917)

12. EVANS, D.H.L., J.G. MURRAY: A study of regeneration in a motor nerve with an unimodal fibre diameter distribution
Anat. Rec. 126, 311 - 333 (1956)

13. FENG, T.P., W.Y. WU, F.Y. YOUNG: Selective reinnervation of a slow or a fast muscle by its original motor supply during regeneration of a mixed nerve
Sc. Sinica Peking 14, 1717 - 1720 (1965)

14. FEX, S.: Functioning remobilisation of vocal cords in cats with permanent recurrent laryngeal nerve paresis
Acta Oto-laryngologica 69 (1969)

15. FEX, S.: Trophic influence of implanted fast nerve on innervated slow muscle
Physiol. bohemoslov., im Druck (1969)

16. FEX, S., B. SONESSON, S. THESLEFF, J. ZELENA: Nerve implants in botulinum poisoned mammalian muscle
J. Physiol. 184, 872 - 882 (1966)

17. FORT, W.B.: An experimental study of the factors involved in the establishment of neuromuscular connections
Diss. a. d. Biol. Univ. of Chicago (1939)

18. GAD, J.: Über einige Beziehungen zwischen Nerv, Muskel und Zentrum. Festschrift zur Feier des 300jährigen Bestehens der Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg
Leipzig 1882, Band II

19. GEREBTZOFF, M.A.: Cholinesterases. A histochemical contribution to the solution of some functional problems
Pergamon Press, New York, p. 60 (1959)

20. GUTH, L.: Neuromuscular function after regeneration of interrupted nerve fibres into partially denervated muscle
Exp. Neurol. 6, 128 - 141 (1962)

21. GUTH, L., A.A. ZALEWSKI: Disposition of cholinesterase following implantation of nerve into innervated and denervated muscle
Exp. Neurol. 7, 316 - 326 (1963)

22. GUTH, L., A.A. ZALEWSKI, W.C. BROWN: Quantitative changes in cholinesterase activity of denervated sole plates following implantation of nerve into muscle
Exp. Neurol. 16, 136 - 147 (1966)

23. GUTH, L., W.C. BROWN, P.K. WATSON: Studies on the role of nerve impulses and acetylcholin release in the regulation of the cholinesterase activity of muscle
Exp. Neurol. 18, 443 - 452 (1967)

24. GUTMANN, E., F.K. SANDERS: Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves
J. Physiol. 101, 489 - 518 (1943)

25. GUTMANN, E., B. JAKUBEK: Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats
Physiol. bohemoslov. 12, 463 - 468 (1963)

26. GWYN, D.G., J.T. AITKEN: New motor endplates and their relationship to muscle fibre injury
Nature 203, 651 - 652 (1965)

27. GWYN, D.G., J.T. AITKEN: The formation of new motor endplates in mammalian skeletal muscle
J. Anat. 100, 111 - 126 (1966)

28. HAJEK, I., E. GUTMANN, I. SYROVY:
Proteolytic activity in denervated and reinnervated muscle
Physiol. bohemoslov. 13, 32 - 38 (1964)

29. HARRISON, R.G.: The outgrow of the nerve fibre as a mode of protoplasmatic movement
J. Exp. Zool. 9, 787 (1910)

30. HOFFMAN, H.: A study of the factors influencing innervation of muscles by implanted nerves
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 29, 289 - 308 (1951)

31. HOFMANN, W.W., S. THESLEFF, J. ZELENA:
Innervation of botulinum poisoned skeletal muscles by accessory nerves
J. Physiol. 171, 27 p. (1964)

32. KIRALY, J.K., K. KRNJEVIC: Some retrograde changes in function of nerves after peripheral section
Quart. J. Exp. Physiol. 44, 244 - 257 (1959)

33. KRÜCKE, W.: Zur Morphologie der Erkrankungsformen peripherer Nervenfasern in:
Chir. plast. et reconstr. 3, 1 - 16 (1967)

34. KÜHNE, W.: Neue Untersuchungen über die motorische Nervenendigung
Z. f. Biologie 23, 1 - 148 (1887)

35. LILEY, A.W.: An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat
J. Physiol. 132, 650 - 666 (1956)

36. LUBINSKA, L.: Axoplasmatic streaming in regenerating and normal nerve fibres in:
Mechanisms of neural regeneration
Progress. in Brain Res. 13, 1 (1964)

37. MAYER, R.F., O. EICKEN, D.C. NASBETH:
Nerve regeneration in replanted canine limb
Am. J. Physiol. 206, 1415 - 1421 (1964)

38. MILEDI, R.: Induced innervation of endplate free muscle segments
Nature 193, 281 - 282 (1962)

39. MILEDI, R.: Formation of extra nerve-muscle junctions in innervated muscle
Nature 199, 1191 - 1192 (1963)

40. MURALT v., A.: Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie
Springer 1958

41. PRESWICK, G.: in: Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie E. KUHN edit.
Springer 1966

42. ROHR-HAGEDORN, I.: Beziehungen zwischen cholinergischem Rezeptor und AChE der Endplatte untersucht während der Degeneration des Mäusezwerchfells
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 19, 119 - 134 (1961)

43. SALAFSKY, B., D. JASINSKI: Early electrophysiological changes after degeneration of fast skeletal muscle
Exp. Neurol. 19, 375 - 387 (1967)

44. SANDERS, F.K., J.Z. YOUNG: The role of the peripheral stump in the control of fibre diameter in regenerating nerves
J. Physiol. 103, 1, 119 (1944)

45. SANDERS, F.K., J.Z. YOUNG: Effect of peripheral connexion on the diameter of nerve fibres
Nature 155, 237 - 238 (1945)

46. SCHMID, R.: Weitere Untersuchungen über regenerationsfördernde Substanzen im Cornealtest
Pflügers Archiv 263, 533 - 541 (1956)

47. SCHWARZACHER, H.G.: Der histochemisch nachweisbare ChE-Gehalt in Muskelendplatten nach Durchschneidung des mot. Nerven
Acta Anat. (Basel) 31, 507 - 531 (1957)

48. SCOTT, D., CHAN-NAO LIU: Effect of nerve growth factor on regeneration of spinal neurons in the cat
Exp. Neurol. 8, 279 - 289 (1963)

49. SHAWE, G.D.H.: On the number of branches formed by regenerating nerve fibres
Brit. J. Surg. 42, 474 - 488 (1955)

50. SEDDON, H.J., P.B. MEDAWAR, H. SMITH: Rate of regeneration of peripheral nerves in man
J. Physiol. 102, 191 - 215 (1943)

51. SLATER, C.R.: Time course of failure of neuromuscular transmission after motor nerve section
Nature 209, 305 - 306 (1966)

52. STRUPPLER, A.: in: Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie E. KUHN edit.
Springer 1966

53. TERRY, R.D., J.C. HARKINS: Regenerating peripheral nerve sheats following Wallerian degeneration
Exp. Cell Res. 13, 193 - 197 (1957)

54. THESLÉFF, S.: Effects of motor innervation on the chemical sensivity of skeletal muscle
Phys. Rev. 40, 734 - 752 (1960)

55. WEISS, P., A. HOAG: Competitive reinnervation of rat muscles by their own and foreign nerves
J. Neurophysiol. 9, 413 - 428 (1946)

56. WEISS, P., A.C. TAYLOR: Further experimental evidence against "neurotropism" in nerve regeneration
J. Exp. Zool. 95, 2, 233 (1944)

57. WIGAND, M.E., C. NAUMANN, G. HÖLLDOBLER: Versuche zur Reinnervation des Abduktormuskels nach Recurrenslähmung durch Einpflanzen freier Nerventransplantate zum N.phrenicus
Arch. klin. exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. 194, 372 (1969)

58. YELLIN, H.: Neural regulation of enzymes in muscle fibres of red and white muscle
Exp. Neurol. 19, 92 - 103 (1967)

59. ZELENA, J., P. HNIK: Motor and receptor units in the soleus muscle after regeneration in very young rats
Physiol. bohemoslov. 12, 277 - 290 (1963)

60. FRANCK, G.B., B. ERICKSON: Increased sensivity of an endplate region of the same cell
Canad. J. Biochem. 37, 1239 - 1246 (1959)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. Malte Erik Wigand für die Überlassung des Themas sowie für seine sachliche Anleitung herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. med. Horst L. Wullstein, in dessen Klinik ich den praktischen Teil der Arbeit durchführen konnte.

Bei der histologischen Auswertung war mir Fräulein G. Hölldobler eine wertvolle Hilfe. Ihr sowie auch Herrn K. Hamberger, der die Herstellung der Graphiken und Fotos besorgte, sei herzlich gedankt.

LEBENSLAUF

Am 22.5.1942 wurde ich als Sohn des Dr.-Ing. Erich Naumann und seiner Ehefrau Dr. med. dent. Charlotte Naumann, geb. Haselhorst, in Halle/Saale geboren.

Nach Grundschuljahren in Halle und Bochum besuchte ich ab 1952 die dortige Goethe-Schule und wechselte 1954 an das Ratsgymnasium nach Osnabrück über. Dort legte ich 1961 meine Reifeprüfung ab.

Anschließend leistete ich 18 Monate Wehrdienst in Hamburg und Idar-Oberstein ab und verließ die Bundeswehr im Herbst 1962 als Lt. der Reserve.

Nach einem halbjährigen physikalischen Praktikum nahm ich im SS 1963 in Tübingen das Studium der Medizin auf, ging nach dem Physikum für ein Semester nach Innsbruck und machte nach dem SS 1969 in Würzburg mein Staatsexamen.

Anschließend begann ich meine Medizinalassistentenzeit an der hiesigen Chirurgischen Klinik und bin zur Zeit auf der Inneren Abteilung des St. Josef-Krankenhauses in Schweinfurt tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher kein anderes Dissertationsthema bearbeitet habe, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Claus Naumann